

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISE RIBEIRO DE BARROS

INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS:  
ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO

CURITIBA  
2018

HELOISE RIBEIRO DE BARROS

INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS:  
ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel C. Riegel Vidotti

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Piovan

CURITIBA  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

---

B277i

Barros, Heloíse Ribeiro de  
Interação entre nanopartículas de ouro e biomoléculas: estudo físico-químico da interface nano-bio /  
Heloíse Ribeiro de Barros. – Curitiba, 2018.  
130 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em  
Química, 2018.

Orientadora: Izabel C. Riegel Vidotti.  
Coorientador: Leandro Piovan.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Interface nano-bio. 3. Biomoléculas. 4. Goma arábica. 5. Quitosana  
sulfatada. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vidotti, Izabel C. Riegel. III. Piovan, Leandro.  
IV. Título.

CDD: 541

---

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

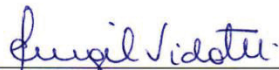
TERMO DE APROVAÇÃO

**INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E  
BIOMOLÉCULAS: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE  
NANO-BIO**

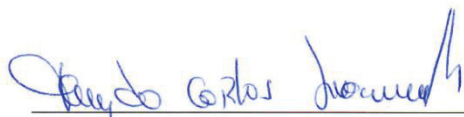
por

**HELOISE RIBEIRO DE BARROS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:




Prof.ª Dr.ª Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata  
Orientador  
Dep. de Química – UFPR



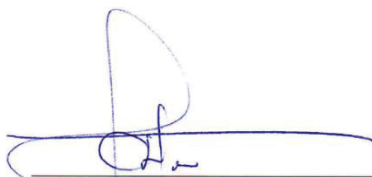
Prof. Dr. Fernando Carlos Giacomelli  
Centro de Ciências Naturais e Humanas – UFABC



Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa  
Instituto de Física – USP



Prof.ª Dr.ª Fernanda Fogagnoli Simas  
Dep. de Biologia Celular – UFPR



Prof. Dr. Marcio Eduardo Vidotti Miyata  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 23 de fevereiro de 2018.



Aos meus pais, irmãos e Willian, por todo  
amor e apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Izabel Riegel pela orientação, apoio e confiança durante esses seis primeiros anos de trabalho juntas. Agradeço pelo exemplo, pelos conselhos, pelas oportunidades e por sempre estar disponível em ajudar, inclusive em assuntos além do laboratório, os quais contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Professor Leandro Piovan pela coorientação, discussões e paciência, as quais foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho e na minha formação.

À Prof Katharina Landfester, pela oportunidade e o prazer em trabalhar em seu grupo.

À Héloïse Thérien-Aubin, minha líder de projeto no MPIP, por todo o aprendizado, discussões e oportunidades, os quais contribuíram muito para o meu desenvolvimento como cientista.

Ao Professor Leandro Barbosa pela participação na minha banca de defesa e, em especial, pelas discussões, em me receber em seu laboratório e grupo e por sempre estar disponível em ajudar, os quais foram muito importantes para o desenvolvimento desse trabalho e do meu aprendizado.

Ao Professor Fernando Giacomelli pela participação na minha banca de qualificação e defesa e pelas discussões importantíssimas levantadas no exame de qualificação.

Ao Professor Marcio Vidotti pela participação na minha banca de defesa e pela convivência, conversas e por toda a ajuda durante esses seis anos.

À Professora Fernanda Simas pela participação na minha banca de defesa e por todos os comentários e discussões do trabalho.

Ao Professor Ney Mattoso pela participação na minha banca de qualificação e, em especial, por todos os ensinamentos, discussões e oportunidades sobre a microscopia eletrônica de transmissão, contribuindo muito para me fazer uma apaixonada pela técnica.

À Professora Nádia Krieger pela participação e discussões na minha banca de qualificação.

À turma da BioCel, Professora Carolina Oliveira, Jenifer Pendiuk, Professora Fernanda Simas, Professora Célia Franco, Daniel Bellan, entre outros, por sempre estarem disponíveis em ajudar, pelas discussões e por todo o aprendizado que eu tive com vocês.

Ao Professor Mario R Meneghetti e Ábner Nunes pela colaboração com os nanobastões de ouro. Ao Professor Guilherme Sasaki e Diego Sabry pela colaboração com a quitosana sulfatada.

À Mary Santos, minha aluna de IC e grande amiga, por toda a ajuda durante meu doutorado e pela oportunidade em despertar o prazer em orientar um trabalho, mas, principalmente, por me ensinar muito.

À todos os amigos e colegas do GPMIn e GCC pela convivência, momentos de descontração, aprendizado e apoio mútuo, os quais fizeram esses seis anos especiais. Em especial à Franciele Wolfart por todas as discussões científicas e não científicas e pela amizade. Aos colegas do LasQue que sempre estiveram disponíveis em ajudar.

Aos amigos e colegas do MPIP, pelos momentos de ajuda e descontração, os quais contribuíram para eu me sentir em casa.

À todos os professores e funcionários do DQUI-UFPR e ao PPGQ-UFPR.

À todos os técnicos que sempre estavam disponíveis em ajudar na realização da pesquisa. Em especial, ao pessoal do CME, ao Christoph Sieber do MPIP e à Andréa e Patrícia (ITC-DEQ).

À Maria Kokkinopoulou por toda a ajuda com a microscopia no MPIP, amizade e momentos de descontração.

À Edileusa Gerhardt (Bioquímica/UFPR) pela ajuda e discussões com a eletroforese.

À minha família, meus pais Benê e Vera, meus irmãos Diogo e Pedro e ao Willian, meu amor, por sempre acreditarem em mim, por todo o apoio, pela compreensão com a minha ausência por vezes, por torcerem e vibrarem comigo em todas as conquistas e por me abraçarem naqueles momentos não tão bons assim. Agradeço muito à todos, pois sem vocês tudo seria mais difícil.

À todos os meus grandes amigos que sempre torceram muito pelas minhas conquistas.

À CAPES pela bolsa de doutorado, ao DAAD pelo auxílio pesquisa e ao MPIP pelo auxílio.

*“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Porque este é limitado, ao passo que aquela abarca o mundo inteiro, abrindo estradas para o progresso. É, estritamente falando, um fator real na pesquisa científica. ”*

Albert Einstein, em Einstein por ele mesmo.

## RESUMO

É bem conhecido que nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam superfície favorável para adsorção de biomoléculas; porém, os efeitos provocados na estrutura, conformação e outras propriedades das biomoléculas ainda são pouco entendidos. Neste trabalho foram utilizadas AuNPs de morfologias diferentes (esferas e bastões) e as biomoléculas goma arábica, quitosana sulfatada, lipase de *Candida* sp. (CALB) e lisozima. São apresentados três estudos das interações envolvidas na interface nano-bio e seus efeitos nas propriedades do material bio-híbrido. No primeiro estudo, foi avaliado o uso dos polissacarídeos naturais goma arábica (GA) e quitosana sulfatada (ChiS) na encapsulação de nanobastões de ouro (AuNRs). As interações foram elucidadas por FTIR e as imagens de microscopias mostraram que estruturas auto-montadas distintas foram obtidas, pois AuNRs individuais foram observadas na presença da ChiS enquanto que *clusters* de AuNRs foram formados na presença da GA. No segundo estudo, foi avaliado o uso da CALB como agente estabilizante para AuNPs. Foi realizado um estudo comparativo adicionando a CALB antes e após a formação das AuNPs. Por imagens de MET e análise por espectroscopia no UV-Vis, foi observado a obtenção de AuNPs estáveis e principalmente esféricas nos dois casos. Por outro lado, caracterizando a conformação da CALB por espectroscopia de fluorescência e de CD, foi observado mudanças em sua estrutura terciária e secundária. A atividade catalítica da CALB foi mantida acima de 80% para os dois materiais bio-híbridos. Pelo estudo de interação, foi avaliado que as mudanças na conformação da CALB dependeram da concentração de AuNPs. No terceiro estudo, foi analisada a influência das AuNPs no processo de fibrilação da lisozima e as interações envolvidas entre as AuNPs e a lisozima na forma globular e fibrilar. As AuNPs desaceleram o início da formação das fibras, porém, após atingir o equilíbrio, foi observado maior quantidade de lisozima na conformação folhas  $\beta$ -pregueadas ao final da fibrilação. Por outro lado, a adição das AuNPs em fibrilas pré-preparadas acarretou em mudanças nesta conformação. Assim, apesar da necessidade de estudos mais aprofundados, as AuNPs se mostraram promissoras em aplicações envolvendo proteínas amilóides. Portanto, os resultados obtidos nos três estudos realizados neste trabalho contribuem para o desenvolvimento de novos materiais nanobioconjugados e para o uso seguro de AuNPs em combinação com biomoléculas.

Palavras-chave: nanopartículas de ouro, interface nano-bio, biomoléculas, goma arábica, quitosana sulfatada, CALB, lisozima, interações coloidais.

## ABSTRACT

It is well-known that gold nanoparticles (AuNPs) exhibit favorable surface that can easily adsorb biomolecules; however, the effects promoted in their structure, conformation and other properties remain poorly understood. We report a study on the involved interactions at the nano-bio interface between AuNPs of different morphologies (spheres and rods) and the biomolecules gum arabic, sulfated chitosan, lipase de *Candida* sp. (CALB) and lysozyme. It is presented three studies of the interactions at the nano-bio interface and their influence on the properties of the bio-hybrid materials. In the first study, it was evaluated the use of the natural polysaccharides gum arabic (GA) and sulfate chitosan (ChiS) in the encapsulation of gold nanorods (AuNRs). The interactions were elucidated by FTIR and the microscopy images showed that distinct self-assembled structures were obtained, since individual AuNRs were observed in presence of ChiS whereas AuNR clusters were formed in presence of GA. In the second study, it was evaluated the use of CALB as stabilizing agent for AuNPs. It was conducted a comparative study where CALB was added before and after the synthesis of AuNPs. By TEM images and UV-Vis analysis, it was observed the formation of stable and mainly spherical AuNPs in both cases. On the other hand, the characterization of CALB conformation through fluorescence and CD spectroscopies showed changes on its secondary and tertiary structure. The catalytic activity of CALB was kept over 80% for the both bio-hybrid materials. By the interactions study, it was evaluated that the changes on CALB conformation depended on the concentration of AuNPs. In the third study, it was analyzed the influence of AuNPs in the lysozyme fibrillation process and the interactions involved between AuNPs and lysozyme in its globular and fibrillar form. The AuNPs slowed down the fibrils formation, however, once the equilibrium is reached, the content of  $\beta$ -sheet was increased at the end of fibrillation. On the other hand, the addition of AuNPs on pre-formed fibrils promoted changes on  $\beta$ -sheet conformation. Then, although a deeper understanding is needed, AuNPs are promising in applications involving amyloid proteins. Therefore, the results obtained in the three presented studies contribute in the developing of new nanobioconjugates materials and for the safe use of AuNPs in combination with biomolecules.

Key-words: gold nanoparticles, nano-bio interface, biomolecules, gum arabic, sulfated chitosan, CALB, lysozyme, colloidal interactions.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Esquema ilustrativo da adsorção de biomoléculas na superfície de nanopartículas, formando a interface nano-bio. Não desenhado em escala. Fonte: adaptado de <sup>16</sup>..... 20
- FIGURA 2. Esquema ilustrativo do (A) efeito de confinamento quântico, representando o aumento das distâncias entre as bandas de valência (BV) e as bandas de condução (BC) em função da diminuição do tamanho da nanopartícula, e do (B) efeito de superfície exemplificando o aumento da razão área/volume em função da diminuição do tamanho da nanopartícula. Fonte: adaptado de <sup>36, 37</sup>..... 22
- FIGURA 3. Esquema representativo da oscilação coletiva dos elétrons, na banda de condução (BC) de nanopartículas metálicas, polarizando a nuvem eletrônica, quando incididos por um campo eletromagnético. Fonte: adaptado com permissão de American Chemical Society <sup>56</sup>..... 24
- FIGURA 4. Perfis de absorção das bandas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em função dos diferentes tamanhos e morfologias das AuNPs, onde estão apresentados AuNPs esféricas menores (preto) e maiores (azul escuro) e os AuNRs com crescentes razões de aspecto (azul claro, verde e vermelho, respectivamente). Fonte: adaptado com permissão de Royal Society of Chemistry <sup>35</sup>..... 25
- FIGURA 5. Esquema representativo da (A) estrutura da goma arábica (GA) e (B) as principais unidades monossacarídicas presentes em sua estrutura. Fonte: Adaptado de <sup>71, 73</sup>..... 28
- FIGURA 6. Estruturas químicas da quitina e quitosana, destacando os grupos funcionais envolvidos no processo de desacetilação. Fonte: adaptado com permissão de Elsevier <sup>85</sup>..... 30
- FIGURA 7. (A) Estrutura geral dos aminoácidos. Exemplos de aminoácidos encontrados nas proteínas, com os respectivos grupos R destacados: (B) leucina, (C) histidina e (D) aspartato. Fonte: adaptado de <sup>67</sup>..... 31
- FIGURA 8. Esquema ilustrativo das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de proteínas. Fonte: adaptado de <sup>67</sup>. .... 32
- FIGURA 9. Esquema ilustrativo do processo de formação das fibras amilóides, apresentando os estágios de agregação. O perfil sigmoidal consiste em uma primeira fase de atraso, seguida da fase de crescimento e, por último, a fase de platô estável. Fonte: adaptado com permissão de Royal Society of Chemistry <sup>123</sup>. .... 35

FIGURA 10. Esquema ilustrativo de um feixe de luz eletromagnético incidente ( $I_0$ ), em uma cubeta contendo a amostra, o qual pode ser transmitido ( $I_{trans}$ ), espalhado ( $I_{esp}$ ) ou refletido ( $I_{ref}$ ) pela da interação com as partículas da amostra. Fonte: adaptado de <sup>91</sup>..... 36

FIGURA 11. Esquema ilustrativo dos níveis de energia de uma molécula. O processo de emissão de fótons ocorre pela (1) excitação eletrônica com a absorção da luz, (2) atingindo um estado eletrônico excitado, seguido da (3) emissão fluorescente e (4) da relaxação ao retornar à um estado eletrônico de menor energia. Fonte: adaptado de <sup>138</sup>..... 38

FIGURA 12. Esquema ilustrativo da luz percorrida em uma cubeta de caminho óptico 1 cm x 1 cm em um fluorímetro. O feixe de luz de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) atinge o centro da cubeta e é emitido ( $\lambda_{em}$ ) na forma de um ângulo de 90°..... 39

FIGURA 13. Espectros de absorção (curva vermelha) e emissão de fluorescência (curva roxa) dos resíduos de aminoácido (A) fenilalanina (Phe), (B) tirosina (Tyr), (C) triptofano (Trp) e suas respectivas estruturas moleculares em (D), (E) e (F) (em meio aquoso). Fonte: adaptado de <sup>142</sup>..... 40

FIGURA 14. Esquema representativo das componentes R (sentido horário) e L (sentido anti-horário) da luz plano polarizada e a sua resultante ao incidir uma amostra em espectrofotômetro de CD. As componentes R e L (A) com a mesma magnitude não tem a sua resultante detectada pelo equipamento e (B) com diferentes magnitudes a resultante é polarizada elipticamente com um ângulo  $\theta$ . Fonte: adaptado de <sup>148</sup>..... 41

FIGURA 15. Espectros de CD de proteínas com estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélice (.....), folhas  $\beta$ -pregueadas (----) e estruturas desordenadas (-). Fonte: adaptado com permissão de Elsevier <sup>149</sup>..... 42

FIGURA 16. Esquema ilustrativo de um equipamento de ITC. A mudança de calor é monitorada pela energia necessária para manter a temperatura constante ( $\Delta T$ ) da cela de medida em relação à cela de referência..... 44

FIGURA 17. Imagens de MET dos (A) AuNRs e após a adsorção com os polissacarídeos (B e C) GA@AuNRs e (D e E) ChiS@AuNRs obtidas em diferentes magnificações. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier..... 56

FIGURA 18. Absorção das bandas SPR no espectro UV-Vis dos AuNRs (espectro preto), GA@AuNRs (espectro vermelho) e ChiS@AuNRs (espectro azul) após a lavagem. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier. .... 58

FIGURA 19. Imagens de MEV-HR dos (A e B) AuNRs, (C e D) GA@AuNRs e (E e F) ChiS@AuNRs. As imagens (A), (C) e (E) correspondem às imagens obtidas por elétrons secundários e as imagens (B), (D) e (F) correspondem às imagens obtidas por elétrons retroespalhados. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier..... 59



FIGURA 20. Espectro de FTIR dos AuNRs e CTAB com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier .....	61
FIGURA 21. Esquema ilustrativo da interação entre os AuNRs e o CTAB. As cadeias alquílicas hidrofóbicas do CTAB interagem entre si formando uma dupla camada na superfície dos AuNRs. Fonte: adaptado de <sup>40, 160</sup> .....	62
FIGURA 22. Espectro de FTIR das GA@AuNRs, AuNRs e GA com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier. ....	63
FIGURA 23. Esquema ilustrativo da organização dos GA@AuNRs promovida pelas interações eletrostáticas entre os grupos carregados positivamente do CTAB presente na superfície dos AuNRs e os grupos carregados negativamente na estrutura da GA.....	65
FIGURA 24. Espectro de FTIR das ChiS@AuNRs, AuNRs e ChiS com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier.....	65
FIGURA 25. Esquema ilustrativo da organização dos ChiS@AuNRs promovida pelas interações eletrostáticas entre os grupos carregados positivamente do CTAB presente na superfície dos AuNRs e os grupos carregados negativamente na estrutura da ChiS.....	66
FIGURA 26. Espectro no UV-Vis das <sub>S</sub> CALB@AuNPs sintetizadas com CALB nas concentrações de 0,42 $\mu\text{molL}^{-1}$ (espectro preto), 20 $\mu\text{molL}^{-1}$ (espectro vermelho) e 42 $\mu\text{molL}^{-1}$ (espectro azul).....	69
FIGURA 27. Imagens de MET da (A) <sub>S</sub> CALB@AuNPs com inset mostrando em detalhe a camada de CALB na superfície da AuNPs adquirida por MET-HR, (B) CALB, (C) AuNPs estabilizadas por citrato e (D) CALB@AuNPs. ....	70
FIGURA 28. Absorção normalizada das bandas SPR no espectro no UV-Vis das AuNPs (espectro preto), <sub>S</sub> CALB@AuNPs (espectro vermelho), CALB@AuNPs (espectro azul).....	71
FIGURA 29. Espectro normalizado de emissão de fluorescência do Trp para CALB (espectro preto), <sub>S</sub> CALB@AuNPs (espectro vermelho) e CALB@AuNPs (espectro azul). ....	72
FIGURA 30. Espectro de CD para a CALB (espectro preto), <sub>S</sub> CALB@AuNPs (espectro vermelho) e CALB@AuNPs (espectro azul), destacando os sinais em 208 nm e 222 nm característicos da estrutura $\alpha$ -hélice.....	73
FIGURA 31. Avaliação da atividade catalítica da CALB (quadrados), CALB@AuNPs (círculos) e <sub>S</sub> CALB@AuNPs (triângulos) na hidrólise do pNPP em função do tempo, monitorando a formação do pNP pela absorbância em $\lambda = 405$ nm no espectro no UV-Vis. A curva representada pelas estrelas é referente a reação controle na ausência de qualquer catalisador (auto-hidrólise do pNPP). As barras	

em preto representam o desvio padrão (SD) e as barras em vermelho representam o erro padrão (SE) da média das 3 medidas. .... 74

FIGURA 32. Valores de potencial zeta da CALB,  $_{SA}CALB@AuNPs$ ,  $CALB@AuNPs$  e AuNPs estabilizadas por citrato. .... 76

FIGURA 33. Perfil de migração em gel de eletroforese das (A)  $CALB@AuNPs$ , (C)  $_{SA}CALB@AuNPs$  e (E) CALB e as respectivas amostras previamente desnaturadas por temperatura  $CALB@AuNPs$ , (D)  $_{SA}CALB@AuNPs$  e (F) CALB. .... 78

FIGURA 34. Monitoramento das mudanças na intensidade de fluorescência (círculos pretos) e nos valores de potencial zeta (círculos vermelhos) pelas subsequentes adições de AuNPs na dispersão de CALB. .... 79

FIGURA 35. Fluorescência do Trp normalizada em função das subsequentes adições de AuNPs na dispersão de CALB. .... 80

FIGURA 36. Centro de massa espectral ( $\langle\lambda\rangle$ ) em função das subsequentes adições de AuNPs na dispersão de CALB. A estrela vermelha representa a mesma  $_{CAuNPs}$  em  $CALB@AuNPs$  analisado nos resultados anteriores. .... 81

FIGURA 37. Imagens das dispersões de (A) lisozima nativa globular e após a incubação em pH 2, 60°C e agitação overnight para obter a (B) lisozima fibrilar.. 84

FIGURA 38. Perfil de migração em gel de eletroforese da lisozima na conformação (A) globular em pH 7, (B) globular em pH 7 e após incubação a 60°C overnight e (C) fibrilar em pH 2 após incubação a 60°C overnight. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 85

FIGURA 39. (A) Absorção da banda SPR no espectro UV-Vis e a respectiva (B) imagem de MET das AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry..... 85

FIGURA 40. Ilustração esquemática das duas estratégias diferentes utilizadas no estudo de interação entre as AuNPs e a lisozima. Estratégia 1: fibrilação da lisozima na presença e ausência das AuNPs. Estratégia 2: estudo de interação entre as AuNPs e a lisozima na conformação globular e fibrilar. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 86

FIGURA 41. Cinética de fibrilação da lisozima monitorada pela fluorescência do ThT na presença de  $_{CAuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (curva preta),  $0,07 \text{ mgL}^{-1}$  (curva vermelha),  $0,3 \text{ mgL}^{-1}$  (curva azul) e  $3,1 \text{ mgL}^{-1}$  (curva rosa). As linhas contínuas correspondem ao ajuste cinético dos dados utilizando a equação 5. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 87

FIGURA 42. Imagens de MET obtidas durante o processo de fibrilação da lisozima nos tempos 0, 30 e 60 min com  $_{CAuNPs} = 0, 0,3 \text{ e } 3,1 \text{ mgL}^{-1}$ . Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 89

FIGURA 43. Reconstrução 3D obtidas por tomografia em MET da fibrilação da lisozima no tempo = 30 min com (A)  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$ , (B)  $C_{AuNPs} = 0,3 \text{ mgL}^{-1}$  e (C)  $C_{AuNPs} = 3,1 \text{ mgL}^{-1}$  e os respectivos modelos de reconstrução 3D sobrepostos em (D), (E) e (F), onde a cor amarela representa a lisozima fibrilar, verde a lisozima globular e o vermelho as AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 90

FIGURA 44. Espectro de CD da lisozima globular (espectro preto) e lisozima fibrilar ao final do processo de fibrilação contendo  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro vermelho),  $C_{AuNPs} = 0,07 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro azul),  $C_{AuNPs} = 0,3 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro rosa),  $C_{AuNPs} = 3,1 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro verde). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 92

FIGURA 45. Espectro de emissão de fluorescência do ThT em lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (círculos pretos fechados) e  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mgL}^{-1}$  (círculos pretos abertos). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 93

FIGURA 46. Espectros de CD da (A) lisozima globular com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro preto) e após a adição de  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro cinza) e (B) lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro preto) e após a adição de  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mgL}^{-1}$  (espectro cinza). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 93

FIGURA 47. Espectro de emissão de fluorescência do Trp da lisozima globular com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (círculos pretos fechados) e  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mgL}^{-1}$  (círculos pretos abertos) e lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  (quadrados cinzas fechados) e  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mgL}^{-1}$  (quadrados cinzas abertos). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 94

FIGURA 48. Relação da intensidade de fluorescência do Trp obtidas em  $\lambda_{\text{max}} = 350$  e 330 nm com as subsequentes adições de  $C_{AuNPs}$  em lisozima globular (círculos abertos) e fibrilar (círculos fechados). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 95

FIGURA 49. Medidas de ITC obtidas da titulação de lisozima globular (círculos fechados) e fibrilar (círculos abertos) em AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 96

FIGURA 50. Imagens de MET das AuNPs adicionadas em (A) lisozima globular e (D) fibrilar. Reconstruções 3D obtidas por tomografia em MET das AuNPs adicionadas em lisozima (B) globular e (E) fibrilar e os respectivos modelos de reconstrução 3D sobrepostos para a lisozima (C) globular e (F) fibrilar, onde a cor amarela representa a estrutura da lisozima fibrilar, verde a lisozima globular e vermelho as AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. .... 97

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição monossacarídica e teor proteico da goma arábica <sup>72</sup> .....	29
TABELA 2 – Atribuições das principais bandas dos espectros no FTIR do CTAB e AuNRs. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier.....	61
TABELA 3 - Atribuições das principais bandas dos espectros no FTIR dos AuNRs, GA, GA@AuNRs, ChiS e ChiS@AuNRs. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier.....	64
TABELA 4 – Parâmetros cinéticos da fibrilação de lisozima na presença de AuNPs. <sup>a</sup> Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da Royal Society of Chemistry. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\langle \lambda \rangle$  - centro de massa espectral  
Asp/Glu – ácido aspártico ou glutâmico  
AuNPs - nanopartículas de ouro  
AuNRs – nanobastões de ouro  
BC - banda de condução  
BV - banda de valência  
CALB – lipase de *Candida* sp.  
CALB@AuNPs – CALB adsorvida em nanopartículas de ouro  
C<sub>AuNPs</sub> - concentração de nanopartículas de ouro  
CD - dicroísmo circular  
Chi – quitosana  
ChiS – quitosana sulfatada  
ChiS@AuNRs - nanobastões de ouro revestidos com quitosana sulfatada  
CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio  
FTIR - espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier  
GA - goma arábica  
GA@AuNRs – nanobastões de ouro revestidos com goma arábica  
HEWL - lisozima de clara de ovo, do inglês *hen egg white lysozyme*  
His – histidina  
HSA - albumina de soro humano  
ICP-OES - espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado  
ITC - calorimetria de titulação isotérmica  
MET - microscopia eletrônica de transmissão  
MEV-HR - microscopia eletrônica de varredura de alta resolução  
MPA - ácido 3-mercaptopropiônico  
MRE - elipticidade molar residual  
M<sub>w</sub> - massa molar média  
Phe - fenilalanina  
pI - ponto isoelétrico  
pNP - *p*-nitrofenolato  
pNPP - palmitato de *p*-nitrofenila  
S<sub>A</sub>CALB@AuNPs – nanopartículas de ouro utilizando CALB como agente estabilizante  
Ser – serina  
SPR - banda de ressonância plasmônica de superfície  
ThT – Tioflavina T  
t<sub>lag</sub> - tempo de atraso  
Trp – triptofano  
Tyr – tirosina  
UV-Vis – ultravioleta-visível  
Φ - rendimento quântico  
ε - coeficiente de absorção molar  
λ<sub>em</sub> – comprimento de onda de emissão  
λ<sub>exc</sub> - comprimento de onda de excitação  
λ<sub>max</sub> - comprimento de onda máximo de absorção ou emissão  
λ – comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
1.1. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	19
1.2. INTERFACE NANO-BIO	19
1.3. NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPS)	21
1.3.1. Características das AuNPs	21
1.3.2. Síntese e obtenção das AuNPs	23
1.3.3. Banda de ressonância plasmônica de superfície (banda SPR)	24
1.3.4. Bioaplicações das AuNPs	26
1.4. BIOMOLÉCULAS	27
1.4.1. Polissacarídeos	27
1.4.1.1. Goma arábica (GA)	28
1.4.1.2. Quitosana (Chi)	29
1.4.2. Proteínas e enzimas	30
1.4.2.1. Lipase de <i>Candida</i> sp. (CALB)	32
1.4.2.2. Lisozima	33
1.4.2.3. Fibrilação de proteínas	34
1.5. PRINCIPAIS TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES NA INTERFACE NANO-BIO	36
1.5.1. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	36
1.5.2. Espectroscopia de fluorescência	37
1.5.3. Espectroscopia de dicroísmo circular	41
1.5.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	43
<b>2. OBJETIVOS</b>	45
2.1. OBJETIVOS GERAIS	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	45
3.1. MATERIAIS	45
3.1.1. Goma arábica (GA)	45
3.1.2. Quitosana sulfatada (ChiS)	45
3.1.3. Lipase de <i>Candida</i> sp. CALB	46
3.1.4. Lisozima	46
3.2. PROCEDIMENTOS	46
3.2.1. Síntese dos nanobastões de ouro (AuNRs)	46
3.2.2. Preparação da GA@AuNRs e ChiS@AuNRs	47

3.2.3.	Síntese AuNPs estabilizadas por citrato.....	47
3.2.4.	Síntese AuNPs utilizando a CALB como agente estabilizante ( <sub>sA</sub> CALB@AuNPs).....	48
3.2.5.	Adsorção da CALB na superfície das AuNPs (CALB@AuNPs) .....	48
3.2.6.	Síntese AuNPs estabilizadas por MPA .....	48
3.2.7.	Fibrilação da lisozima .....	49
3.2.8.	Determinação da atividade enzimática pela reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila ( <i>p</i> NPP) .....	49
3.3.	CARACTERIZAÇÃO .....	50
3.3.1.	Quantificação de ouro por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) .....	50
3.3.2.	Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) .....	50
3.3.3.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	50
3.3.4.	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-HR) .....	51
3.3.5.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	51
3.3.6.	Potencial zeta.....	52
3.3.7.	Eletroforese em gel .....	52
3.3.8.	Espectrofotometria de fluorescência .....	52
3.3.9.	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) .....	53
3.3.10.	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) .....	54
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
4.1.	ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE NANOBASTÕES DE OURO E POLISSACARÍDEOS.....	55
4.1.1.	Motivação do trabalho.....	55
4.1.2.	Objetivos específicos .....	55
4.1.3.	Resultados e discussão.....	56
4.1.4.	Conclusões parciais .....	66
4.2.	ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA IMOBILIZAÇÃO DA CALB EM NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	67
4.2.1.	Motivação do trabalho.....	67
4.2.2.	Objetivos específicos .....	68
4.2.3.	Resultados e discussão.....	68
4.2.4.	Conclusões parciais .....	82
4.3.	ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E LISOZIMA E SEU IMPACTO NA FORMAÇÃO DE FIBRAS AMILÓIDES DO TIPO FOLHAS $\beta$ -PREGUEADAS .....	83
4.3.1.	Motivação do trabalho.....	83
4.3.2.	Objetivos específicos .....	83
4.3.3.	Resultados e discussão.....	84

4.3.4. Conclusões parciais .....	98
<b>5. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE 4 .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>126</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Embora a nanotecnologia venha avançando muito nos últimos anos com o desenvolvimento de novos materiais de propriedades singulares e aplicações potenciais, os seus efeitos provocados nas biomoléculas presentes em meios biológicos ainda é pouco entendido. A elucidação das interações envolvidas na interface entre os nanomateriais e as biomoléculas é fundamental para a aplicação dos nanomateriais, na fabricação de estruturas nanobioconjugadas, além da avaliação de seus efeitos biocompatíveis ou bioadversos <sup>1-4</sup>. Portanto, o estudo dos fenômenos que ocorrem na interface nano-bio permitem o desenvolvimento de metodologias para o uso seguro dos nanomateriais e design de novos materiais para aplicações biológicas.

Dessa forma, este trabalho propõe o estudo das interações na interface entre nanopartículas de ouro e biomoléculas, explorando as interações coloidais envolvidas e os efeitos causados em suas respectivas propriedades intrínsecas. Foram exploradas as interações entre nanopartículas de ouro esféricas (AuNPs) e na forma de bastões (AuNRs) com polissacarídeos naturais (goma arábica e quitosana sulfatada) e enzimas (CALB e lisozima) e a relação dessas interações com as estruturas e/ou funções dessas biomoléculas. O estudo das interações na interface nano-bio utilizando nanopartículas de ouro é de grande interesse por estas serem muito exploradas e terem suas propriedades bem-estabelecidas (como controle de síntese, características da superfície química e propriedades plasmônicas) com uma quantidade crescente de trabalhos utilizando as nanopartículas de ouro principalmente para bio-aplicações.

### 1.2. INTERFACE NANO-BIO

A nanociência e a nanotecnologia não se restringem à uma área científica isolada, ela é uma complexa base que integra ciências fundamentais como química, física e biologia, com enorme interdisciplinaridade que abrange diferentes áreas desde a medicina e a biotecnologia à outras como engenharia e tecnologia da informação, entre muitos outros exemplos <sup>5-7</sup>. Com isso, a nanociência e a nanotecnologia vêm apresentando grandes avanços nos últimos anos, desenvolvendo nanomateriais organizados com grande potencial em trazer novas

alternativas para problemas da sociedade através de tecnologias com propriedades inovadoras <sup>5-8</sup>.

No entanto, apesar da rápida expansão do desenvolvimento e aplicação dos nanomateriais, ainda há muitas dúvidas em relação aos efeitos adversos e tóxicos que estes materiais podem provocar a meios biológicos <sup>3, 9, 10</sup>. Estudos mostram que os efeitos biológicos que podem ser provocados por nanomateriais não são determinados apenas pela sua composição química, mas também são dependentes das características das partículas, como tamanho, morfologia, carga superficial e modificação química da superfície <sup>3, 10-13</sup>. Além disso, quando em contato com meios biológicos, a interface entre o nanomaterial e as biomoléculas presentes no meio também apresenta as suas próprias características, tais como tamanho, dimensão e carga de superfície <sup>3</sup>. Logo, as características da interface nano-bio que surgem nesses sistemas dependem da natureza das interações entre os nanomateriais e as biomoléculas.

De maneira simplificada, a interface nano-bio consiste em três componentes principais: a superfície do nanomaterial, as biomoléculas adsorvidas e a interface entre o nanomaterial e as biomoléculas <sup>1, 3, 14</sup>, conforme ilustrado esquematicamente na FIGURA 1. As principais forças intermoleculares que ocorrem na interface nano-bio são interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as biomoléculas e a superfície da nanopartícula <sup>3</sup>. Essas interações podem influenciar tanto as propriedades dos nanomateriais como das biomoléculas <sup>15</sup>. Consequentemente, o conhecimento dos fenômenos que ocorrem

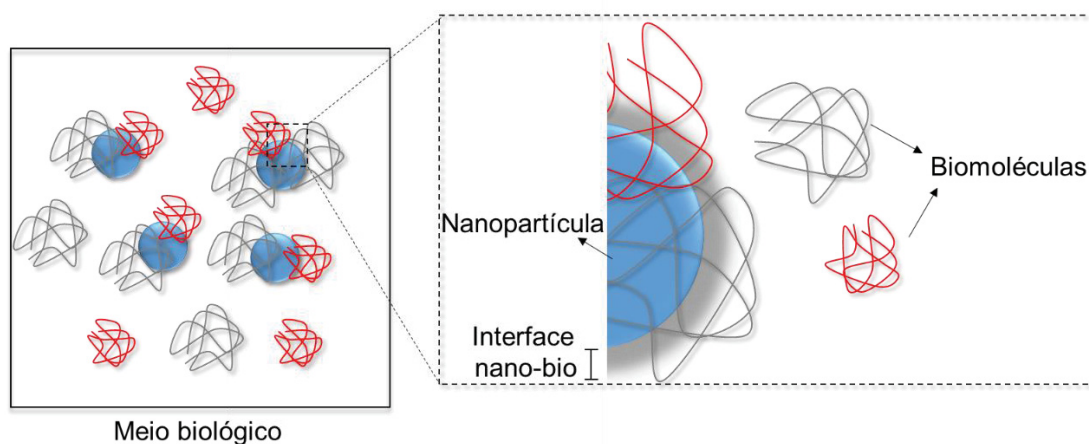


FIGURA 1. Esquema ilustrativo da adsorção de biomoléculas na superfície de nanopartículas, formando a interface nano-bio. Não desenhado em escala. Fonte: adaptado de <sup>16</sup>

na interface nano-bio é fundamental para o desempenho dos nanomateriais em sistemas biológicos e da síntese de estruturas nanobioconjugadas, assim como a utilização segura destes materiais <sup>5, 6, 13, 15, 17</sup>. A performance e o uso seguro dos nanomateriais são essenciais para a avaliação da toxicidade, biodistribuição e manutenção das propriedades tanto do nanomaterial como das entidades biológicas <sup>1, 18</sup>. No entanto, a elucidação desses fenômenos ainda é um desafio para os pesquisadores devido à natureza dinâmica e complexa que ocorre na interface nano-bio <sup>3</sup>.

Nos últimos anos, houve um aumento no número de estudos relacionados à interface nano-bio que avaliaram a aplicação dos nanomateriais em meios biológicos e no desenvolvimento de materiais nanobioconjugados <sup>1, 17, 19</sup>. Por exemplo, foi estudada a adsorção imediata das proteínas presentes em meios biológicos as quais formaram uma coroa de proteínas na superfície dos nanomateriais <sup>20-23</sup>. Com isso, também surgiram investigações de grande importância sobre as mudanças de conformação das proteínas quando adsorvidas na superfície dos nanomateriais e o impacto que essas alterações podem causar na estabilidade e funções desses materiais <sup>15, 24</sup>. Outros estudos exploraram as propriedades de montagem entre os nanomateriais e biomoléculas específicas para a fabricação de novos materiais nanobioconjugados <sup>19, 25, 26</sup>.

Portanto, estes estudos vêm contribuindo para as investigações das interações na interface nano-bio em condições reais, as quais são consideradas como um grande desafio para os estudos nanobiológicos <sup>3</sup>. Dessa forma, as carências no conhecimento sobre os fenômenos que ocorrem em nível molecular e celular estão sendo identificadas e soluções estão sendo criadas para superar as limitações dos métodos atuais. Como resultado, nanomateriais com performance biológica otimizada e de uso seguro estão sendo desenvolvidos para aplicações em biosensores, biocatálise, nanobiodispositivos, entre outros <sup>1, 3, 27</sup>.

### 1.3. NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPS)

#### 1.3.1. Características das AuNPs

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm atraído o interesse de cientistas durante todo o último século, mas é considerado que o avanço das pesquisas com AuNPs foi acelerado a partir da década de 2000, com a síntese de diversas morfologias 1D, 2D e 3D e de estruturas ocas <sup>28, 29</sup>. Comparado com outras

nanopartículas metálicas, as AuNPs apresentam diversas vantagens devido às suas propriedades ópticas, magnéticas, eletrônicas e outras propriedades que podem ser controladas <sup>28, 30</sup>. Dessa forma, essas características proporcionam o desenvolvimento de materiais inteligentes com AuNPs os quais podem ser utilizados em nível biomolecular <sup>30</sup>. Além disso, associado a fácil funcionalização de sua superfície, amplia muito a diversidade de aplicações das AuNPs <sup>28</sup>.

Três propriedades principais para o sucesso das AuNPs são destacadas <sup>31</sup>. Em primeiro lugar, a estabilidade física das AuNPs, a qual implica em sua biocompatibilidade. Além disso, ressalta a facilidade de funcionalização da superfície das AuNPs com biomoléculas e moléculas orgânicas e, por último, a grande variedade de propriedades ópticas relacionadas à ressonância plasmônica de superfície das AuNPs <sup>32-34</sup>.

Essas propriedades são originadas principalmente pela elevada razão área/volume das nanopartículas. Como resultado, são gerados os efeitos de confinamento quântico e os efeitos de superfície <sup>35, 36</sup>, os quais estão representados esquematicamente na FIGURA 2.

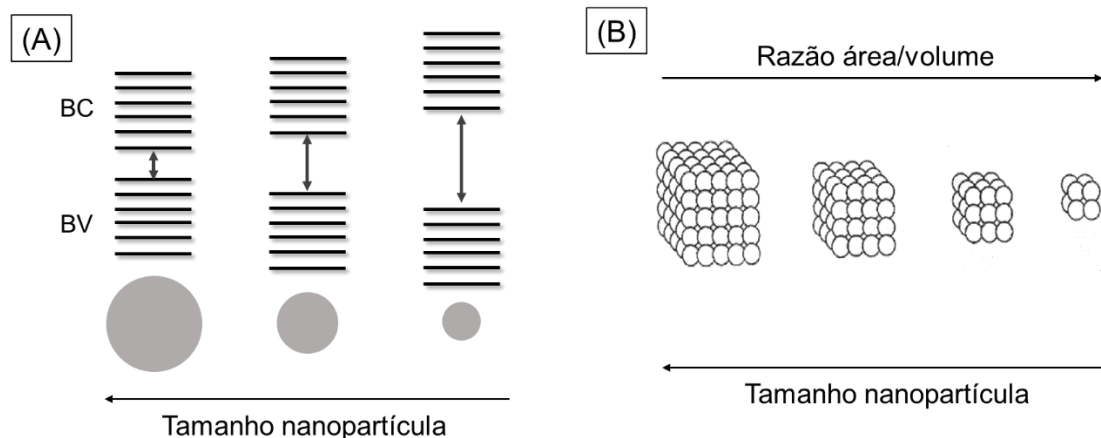


FIGURA 2. Esquema ilustrativo do (A) efeito de confinamento quântico, representando o aumento das distâncias entre as bandas de valência (BV) e as bandas de condução (BC) em função da diminuição do tamanho da nanopartícula, e do (B) efeito de superfície exemplificando o aumento da razão área/volume em função da diminuição do tamanho da nanopartícula. Fonte: adaptado de <sup>36, 37</sup>.

O efeito de confinamento quântico ocorre devido aos elétrons ocuparem um volume reduzido nos orbitais atômicos ou moleculares das nanopartículas <sup>36</sup>. Com isso, os elétrons ficam confinados e são impedidos de se deslocarem livremente entre as bandas de valência (BV) e as bandas de condução (BC). Com a diminuição

do tamanho das nanopartículas e o aumento da razão superfície/volume, a distância entre as bandas BV e BC aumenta e os elétrons ficam cada vez mais confinados, levando ao aumento da energia total do sistema <sup>35, 36</sup>, conforme ilustrado na FIGURA 2(A). O efeito de superfície ocorre pela elevada energia superficial das nanopartículas <sup>36, 38</sup>. Os átomos presentes na superfície são mais energéticos por terem número de coordenação incompleto e poucos átomos vizinhos ligados a eles. Dessa forma, com a diminuição do tamanho das nanopartículas e o aumento da razão superfície/volume, a fração de átomos na superfície é maior em relação à quantidade total de átomos na partícula, provocando o aumento da energia total do sistema <sup>36, 38</sup>, conforme representado na FIGURA 2(B). Devido à elevada atividade superficial, as nanopartículas apresentam a tendência de se agregarem a fim de diminuir a energia total. Para contornar esse problema, normalmente, a síntese das nanopartículas é feita na presença de agentes estabilizantes <sup>39</sup>.

### 1.3.2. Síntese e obtenção das AuNPs

Para a obtenção das AuNPs, a estratégia comumente utilizada é pelo uso de agentes redutores para promover a nucleação dos íons de ouro e formarem as nanopartículas <sup>34, 40</sup>. Entre elas, a estratégia mais utilizada é pela redução do  $\text{HAuCl}_4$  em água por citrato de sódio, descrita pela primeira vez por Turkevitch em 1951, onde foram obtidas AuNPs esféricas de cerca de 20 nm <sup>34, 41</sup>. Por outro lado, a síntese de AuNPs utilizando o  $\text{NaBH}_4$  como agente redutor produz nanopartículas ainda menores e mais monodispersas do que as obtidas pelo método de Turkevitch, obtendo AuNPs esféricas com diâmetro em torno de 5 nm <sup>42</sup>. A síntese de AuNPs utilizando tióis como agentes estabilizantes, os quais são amplamente empregados atualmente, foi descrito pela primeira vez apenas em 1993 por Mulvaney e Giersig <sup>34, 43</sup>. O desenvolvimento dos métodos conhecidos como *seed-mediated* para a obtenção de nanopartículas isotrópicas, desencadeou uma série de estudos e, provavelmente, fez das AuNPs a classe de nanopartículas metálicas com mais trabalhos de diferentes morfologias <sup>34</sup>. Como por exemplo, Wiesner e Wokaun demonstraram pela primeira vez AuNPs no formato de nanobastões obtidas pelo método *seed-mediated* e, posteriormente, sínteses com melhor controle de morfologias foram apresentadas em diversos trabalhos de Murphy nos anos 2000 <sup>34, 44-48</sup>.

Além das diversas morfologias, as AuNPs são muito atrativas por poderem facilmente ser preparadas e modificadas por uma variedade enorme de biomoléculas como aminoácidos, peptídeos, proteínas, enzimas, DNA, RNA, entre outras <sup>49-52</sup>. As biomoléculas podem atuar como um “molde” para o crescimento e formação das AuNPs quando presentes durante a síntese <sup>19</sup>. Estas biomoléculas apresentam sítios de interação específicos com as facetas nanocristalinas das AuNPs, levando à formação de novas estruturas e/ou arranjos complexos que antes não seriam obtidos <sup>19</sup>. Com isso, a partir dessas interações, funções biológicas são inseridas nas AuNPs. Além disso, por sua vez, essa interação pode melhorar as propriedades das biomoléculas, como por exemplo, o aumento da estabilidade e atividade catalítica de enzimas <sup>27</sup>.

### 1.3.3. Banda de ressonância plasmônica de superfície (banda SPR)

Sob a incidência de uma radiação eletromagnética, os elétrons presentes na BC das AuNPs são oscilados coletivamente <sup>53,54</sup>. Como resultado, há a polarização da nuvem eletrônica e ocorre uma absorção acentuada de energia em determinado comprimento de onda no espectro na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), conforme representado na FIGURA 3 <sup>54</sup>. Esses efeitos dão origem a conhecida banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR), a qual é uma excelente ferramenta de monitoramento das AuNPs <sup>53</sup>. A banda SPR é observada apenas para metais com elétrons livres na banda de condução <sup>53</sup>. Basicamente, apenas Au, Ag e Cu apresentam banda SPR na região do visível, sendo que Au e Ag são os mais estudados por terem melhor estabilidade química <sup>53, 55</sup>.

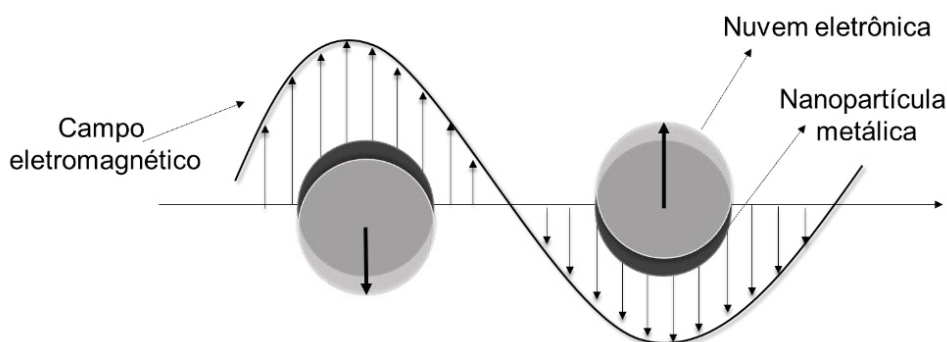


FIGURA 3. Esquema representativo da oscilação coletiva dos elétrons, na banda de condução (BC) de nanopartículas metálicas, polarizando a nuvem eletrônica, quando incididos por um campo eletromagnético. Fonte: adaptado com permissão de *American Chemical Society* <sup>56</sup>.

O perfil da banda SPR depende principalmente do tamanho, morfologia e o meio de dispersão das AuNPs.<sup>53</sup> A FIGURA 4 a seguir apresenta a comparação de bandas SPR de AuNPs de diferentes tamanho e morfologias. Nanopartículas de tamanhos maiores apresentam banda SPR deslocada para comprimentos de onda maiores devido ao tamanho maior da nuvem eletrônica polarizada<sup>35</sup>. Nanopartículas anisotrópicas podem apresentar mais de uma banda SPR no espectro UV-Vis. Como por exemplo, os nanobastões de ouro (AuNRs), os quais apresentam duas bandas SPR, uma transversal e outra longitudinal, devido a orientação das duas dimensões do nanobastão em relação ao campo eletromagnético<sup>35, 53</sup>. A razão entre o comprimento e largura dos AuNRs é chamada de razão de aspecto.

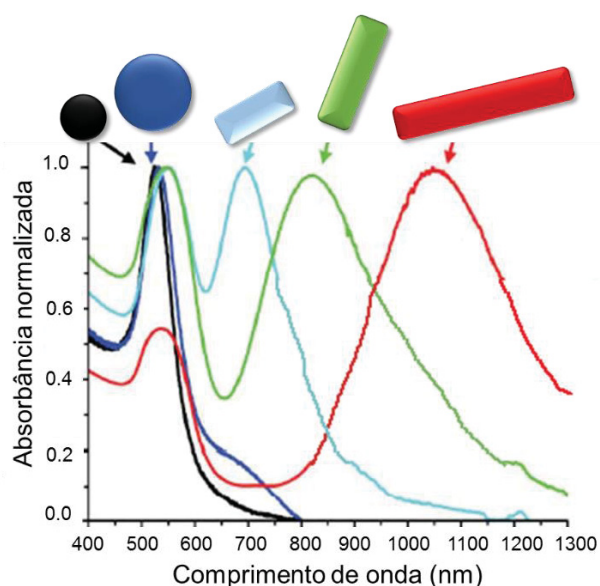


FIGURA 4. Perfis de absorção das bandas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em função dos diferentes tamanhos e morfologias das AuNPs, onde estão apresentados AuNPs esféricas menores (preto) e maiores (azul escuro) e os AuNRs com crescentes razões de aspecto (azul claro, verde e vermelho, respectivamente). Fonte: adaptado com permissão de *Royal Society of Chemistry*<sup>35</sup>.

Além disso, a banda SPR depende de vários outros fatores associados ao meio dispersante, como a constante dielétrica e o pH, e pela interação com outras moléculas, pois alteram a distribuição da densidade de cargas na superfície das AuNPs e, consequentemente, a oscilação coletiva dos elétrons presentes na BC<sup>53</sup>.<sup>57</sup> Com isso, o monitoramento da SPR tem se tornado uma ferramenta excelente para o estudo e aplicações das AuNPs<sup>34</sup>, como por exemplo, no monitoramento da



estabilidade de AuNPs em diferentes fluídos fisiológicos simulados <sup>17, 39, 58</sup> e na adsorção de polissacarídeos em AuNRs <sup>24, 40, 59</sup>.

#### 1.3.4. Bioaplicações das AuNPs

As propriedades das AuNPs têm muito destaque em aplicações biomédicas <sup>28, 57</sup>. Como por exemplo, a superfície das AuNPs pode ser funcionalizada para o reconhecimento de moléculas específicas, como proteínas e DNA, em meios biológicos e podem ser monitoradas pelas mudanças de absorção da banda SPR <sup>28</sup>. As AuNPs também têm apresentado resultados de grande interesse em aplicações de terapia fototermal por apresentarem larga absorção na região do infravermelho próximo <sup>57, 60</sup>. Outra característica interessante é que as AuNPs permanecem por longo tempo na circulação sanguínea e são acumuladas seletivamente em lugares de interesse através das características do efeito de aumento de retenção e permeação (EPR) e também pela modificação de superfície com moléculas específicas <sup>28, 57, 61, 62</sup>.

Os estudos com as AuNPs que combinam as propriedades de ambos agentes terapêuticos e de diagnóstico em um único material deu origem ao conceito *theranostic* <sup>28</sup>. Resultados significativos estão sendo obtidos, onde estão sendo desenvolvidas estratégias para o tratamento e diagnóstico de doenças com redução dos efeitos colaterais <sup>63</sup>. Como por exemplo, as AuNPs vêm apresentando resultados promissores para detecção e tratamento de câncer, Alzheimer, HIV, hepatite, diabetes, entre outras <sup>57</sup>. Dessa forma, as pesquisas voltadas para o estudo das interações entre as AuNPs e as proteínas detectadas nessas doenças têm sido cruciais para explorar o potencial das AuNPs na detecção e tratamento de diferentes doenças <sup>64</sup>.

Além disso, as pesquisas com as AuNPs vêm apresentado o desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico e tratamento precoce de doenças como o câncer e está contribuindo para o aumento das taxas de sobrevivência dos pacientes <sup>28, 61</sup>. O desenvolvimento de novos métodos que ofereçam técnicas que combatam esse tipo de doença sem a necessidade de cirurgia será um enorme avanço na medicina <sup>65</sup>. Além disso, o objetivo de tratamentos utilizando AuNPs bioconjugadas é no futuro conseguir diminuir os efeitos colaterais que há nos tratamentos convencionais, superar problemas com solubilidade e estabilidade das drogas, melhorando a sua eficiência e



biodistribuição. Entre todas as propriedades das AuNPs, a sua boa dispersão e estabilidade tem efeito significativo afetando diretamente no seu desempenho terapêutico final <sup>66</sup>. No entanto, ainda pouco se sabe dos efeitos a longo prazo com a exposição das AuNPs e dos impactos ambientais que as AuNPs podem causar <sup>32</sup>.

#### 1.4. BIOMOLÉCULAS

As biomoléculas são sintetizadas por organismos vivos e apresentam funções biológicas específicas <sup>67</sup>. As suas funções biológicas são extremamente dependentes da estrutura e conformação da biomolécula. Além disso, as ligações covalentes e os grupos funcionais presentes em sua estrutura também tem papel importante nas funções desempenhadas <sup>67</sup>. Alguns exemplos de biomoléculas são as proteínas, os polissacarídeos, os ácidos nucleicos e os lipídeos.

Devido à grande importância das funções biológicas dessas moléculas, há muito tempo diversos trabalhos vêm sendo realizados a fim de investigar suas propriedades. Além disso, atualmente, novos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de combinar as propriedades biológicas das biomacromoléculas com outros materiais para construir novos materiais híbridos com o sinergismo das propriedades <sup>19</sup>.

##### 1.4.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são carboidratos, os quais são as biomoléculas mais abundantes no planeta e estão presentes nos organismos dos cinco reinos dos seres vivos <sup>67</sup>. Os polissacarídeos são biopolímeros com estrutura composta por pelo menos 20 unidades sacarídeas unidas por ligações glicosídicas, podendo ter cadeias lineares ou ramificadas <sup>67</sup>. Eles diferem entre si pelas unidades sacarídeas que compõem sua estrutura, no tamanho das cadeias e no grau de ramificação <sup>67</sup>.

Os polissacarídeos apresentam uma variedade de grupos funcionais em sua estrutura, tais como grupos amino, hidroxilas e carboxilatos os quais são atrativos para interagir com a superfície das AuNPs <sup>68</sup>. Em geral, as interações entre os polissacarídeos e as AuNPs são favoráveis e estabilizam as AuNPs. Além disso, por serem produtos naturais, os polissacarídeos têm propriedades atrativas para aplicações biológicas como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade <sup>69</sup>. Com isso, os polissacarídeos vêm sendo empregados como agentes

estabilizantes para AuNPs esféricas de forma bem sucedida <sup>39, 68</sup>. Porém, poucos trabalhos são encontrados utilizando os polissacarídeos como agentes estabilizantes para AuNPs de outras morfologias <sup>40</sup>.

#### 1.4.1.1. Goma arábica (GA)

A goma arábica (GA) é um polissacarídeo exsudado naturalmente dos troncos e cascas das árvores de acácia. A goma é produzida como mecanismo de defesa quando as árvores sofrem algum tipo de estresse, como ataque microbiano ou lesões físicas <sup>70</sup>. As espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal* são naturais dos países africanos onde a GA extraída apresenta alto valor comercial <sup>71</sup>. No Brasil, são plantadas as árvores de acácia da espécie *Acacia mearnsii* principalmente na região sul do país, onde são exploradas a sua casca para extração de taninos e o tronco para lenha; porém, a goma exsudada é descartada e ainda não apresenta valor comercial <sup>62, 70, 71</sup>.

A estrutura da GA é bastante ramificada e altamente complexa <sup>72, 73</sup>, composta por monossacarídeos neutros (galactose, arabinose e ramnose) e ácidos (ácido glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico), e também por frações de proteínas de massa molar alta e baixa, que constituem em torno de 5 a 20% em massa da composição <sup>71-74</sup>. A FIGURA 5 apresenta a estrutura esquemática da GA e os principais monossacarídeos que a constitui. A composição monossacarídica e o teor proteico da GA estão apresentados na TABELA 1. A quantidade e a distribuição das frações de monossacarídeos e proteínas na estrutura da GA conferem caráter anfifílico à GA, contribuindo para a sua atividade interfacial <sup>75, 76</sup>.

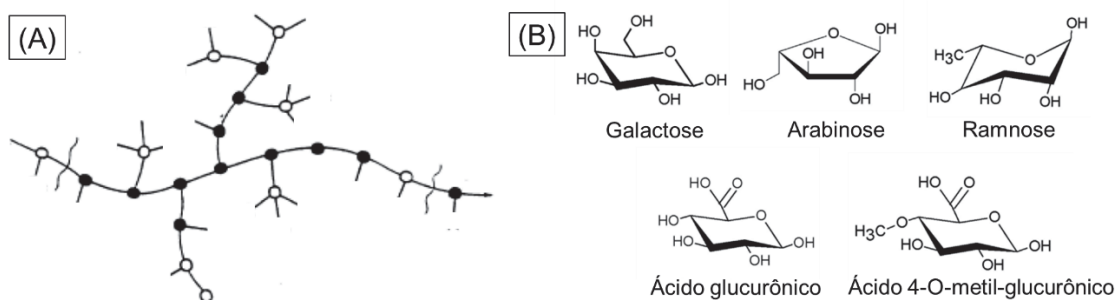


FIGURA 5. Esquema representativo da (A) estrutura da goma arábica (GA) e (B) as principais unidades monossacarídicas presentes em sua estrutura. Fonte: Adaptado de <sup>71, 73</sup>.

TABELA 1. Composição monossacarídica e teor proteico da goma arábica<sup>72</sup>.

Amostra	Composição monossacarídica (%)				Açúcar total (%)	Proteína (%) <sup>b</sup>
	Ramnose	Arabinose	Galactose	Ácido urônico <sup>a</sup>		
GA	13	31	39	17	95	4

<sup>a</sup> Dosado pelo método <sup>77</sup>.<sup>b</sup> Dosado pelo método <sup>78</sup>.

Com isso, a GA apresenta ótimas propriedades emulsificantes, estabilizantes e espessantes, pelas quais é amplamente empregada nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, além das suas características de biocompatibilidade e baixa toxicidade que também contribuem para essas aplicações <sup>70, 79, 80</sup>. Com a diversidade de grupos funcionais presentes em sua estrutura (carboxilas, hidroxilas, amino) e a sua estrutura ramificada complexa, a GA tem se mostrado um excelente agente estabilizante para diversos tipos de nanomateriais <sup>39, 40, 73, 75, 79, 81-83</sup>.

#### 1.4.1.2. Quitosana (Chi)

A quitosana (Chi) é um polissacarídeo linear, formada pelas unidades monossacarídicas de *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina unidas por ligação β-glicosídicas (1→4), distribuídas aleatoriamente na cadeia <sup>84</sup>. É obtida pela desacetilação da quitina, a qual é extraída dos exoesqueletos de invertebrados <sup>84, 85</sup>. A desacetilação é feita por um tratamento com solução alcalina concentrada para hidrolisar o grupo acetila da quitina <sup>84</sup>, conforme esquematizado na FIGURA 6. Com isso, a solubilidade da quitosana se torna maior do que a da quitina, porém, mesmo assim, a quitosana de massa molar alta e média é solúvel apenas em soluções com pHs em torno de 3,5, apesar do seu pKa ser 6,3 <sup>68, 84</sup>. Estratégias para melhorar a solubilidade da Chi são realizadas pela modificação da sua estrutura química, como por exemplo, com a inserção de grupos sulfatos, os quais aumentam a sua solubilidade em meio aquoso <sup>40, 86, 87</sup>.

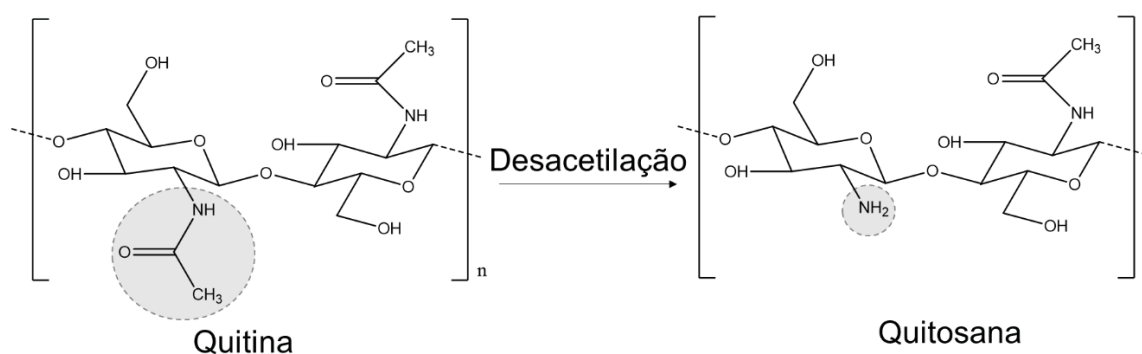


FIGURA 6. Estruturas químicas da quitina e quitosana, destacando os grupos funcionais envolvidos no processo de desacetilação. Fonte: adaptado com permissão de *Elsevier* <sup>85</sup>.

As propriedades da Chi podem variar dependendo do grau de desacetilação promovido, tamanho molecular e polidispersão de tamanho <sup>84</sup>. A Chi é muito utilizada para aplicações biológicas por ser biodegradável, biocompatível e ter baixa toxicidade <sup>86, 88</sup>. Além disso, a Chi apresenta propriedades antimicrobianas, antitumorais, anticoagulantes e de cicatrização as quais são muito atrativa para o uso em carreadores de fármacos, peles artificiais e anticoagulantes de sangue <sup>84, 86</sup>. Ainda, a Chi também é utilizada em processos industriais para ser empregada como espessantes, adesivos, membranas e agentes quelantes para metais <sup>84</sup>.

Além disso, a Chi apresenta propriedades de interesse para ser aplicada em processos de interação, como por exemplo, em membranas celulares <sup>89</sup>. Essa característica é resultado dos grupos aminos que estão protonados na estrutura da Chi quando dissolvida em meios fisiológicos <sup>85, 90</sup>. Dessa forma, a Chi se torna uma macromolécula catiônica fazendo com que ela tenha interações favoráveis com superfícies carregadas negativamente <sup>85, 90</sup>. Com isso, ela apresenta interações favoráveis com as AuNPs, mostrando ótimas propriedades de estabilização coloidal <sup>88</sup>.

#### 1.4.2. Proteínas e enzimas

As proteínas são biopolímeros responsáveis por diversas funções biológicas essenciais <sup>91</sup>. Como por exemplo, as proteínas apresentam propriedades catalíticas, de transporte e armazenamento de moléculas pequenas, no controle de diferentes processos mecânicos, de imunidade, transmissão, crescimento, entre muitas outras propriedades <sup>92</sup>. Por essa razão, o estudo de proteínas é sempre de grande interesse.

Estruturalmente, as proteínas são macromoléculas constituídas por uma cadeia de aminoácidos (cadeia polipeptídica) em uma sequência específica, sendo que a diferenciação entre as diversas proteínas se dá em função da proporção e distribuição destes resíduos em sua estrutura<sup>67</sup>. Os resíduos de aminoácidos são compostos por um átomo de carbono central, ligado a um grupo carboxila, um grupo amino e um grupo R, conforme apresentado na FIGURA 7(A). Os aminoácidos se diferenciam pela estrutura do grupo R, resultando nas diferentes propriedades entre os aminoácidos<sup>67, 92</sup>. Alguns exemplos dos aminoácidos são apresentados na FIGURA 7(B-D), com seus respectivos grupos R destacados: (B) leucina, o aminoácido mais recorrente nas proteínas, (C) histidina, um dos aminoácidos presentes no sítio catalítico da CALB e, (D) aspartato, um dos aminoácidos presentes no sítio catalítico da lisozima.

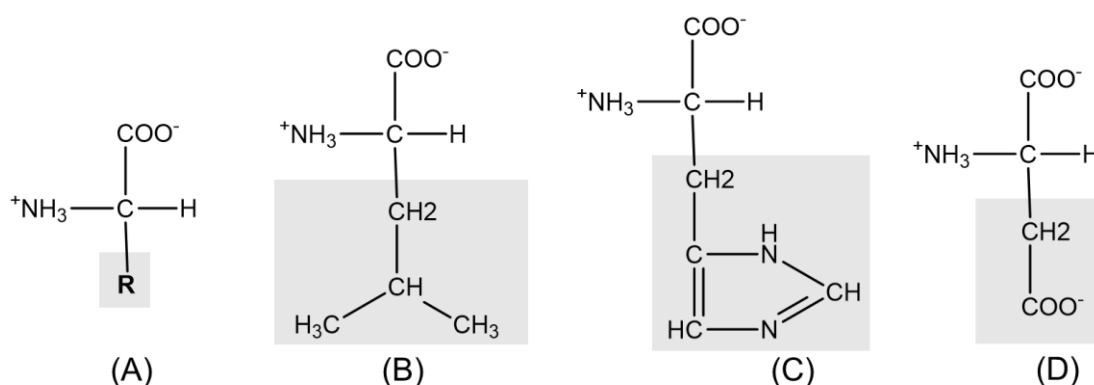


FIGURA 7. (A) Estrutura geral dos aminoácidos. Exemplos de aminoácidos encontrados nas proteínas, com os respectivos grupos R destacados: (B) leucina, (C) histidina e (D) aspartato. Fonte: adaptado de<sup>67</sup>

A sequência dos resíduos de aminoácidos forma a estrutura primária de proteínas. A partir das atrações ou repulsões entre os grupos R dos resíduos de aminoácidos, a cadeia polipeptídica se rearranja a fim de obter uma conformação mais estável formando a estrutura secundária de proteínas<sup>67</sup>. A estrutura secundária pode ser enovelada na forma de  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$ -pregueadas ou ainda outras formas irregulares e pode ser caracterizada, por exemplo, pela técnica de espectroscopia de dicroísmo circular. Estas estruturas podem ser dobradas em um rearranjo tridimensional, formando a estrutura terciária, a qual geralmente é caracterizada pela fluorescência de resíduos hidrofóbicos como o triptofano (Trp)<sup>67</sup>. Ainda, proteínas com mais de uma subunidade polipeptídica, podem se auto-

montar, dando origem à estrutura quaternária das proteínas <sup>67</sup>. A FIGURA 8 ilustra as diferentes estruturas de uma proteína.

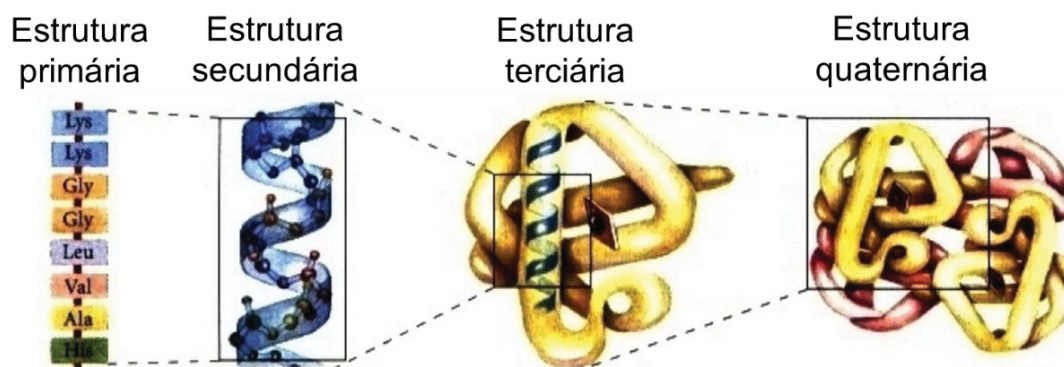


FIGURA 8. Esquema ilustrativo das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de proteínas. Fonte: adaptado de <sup>67</sup>.

As enzimas são uma classe especial das proteínas pela sua função catalítica nas mais diversas reações em todos os organismos <sup>67</sup>. Elas são biocatalisadores notáveis, apresentam quimio-, régio- e estereosseletividade, muito atrativas para diversas aplicações na indústria, biotecnologia e pesquisa <sup>93-95</sup>. Em geral, as enzimas podem catalisar reações com velocidades de 5 a 17 ordens de grandeza maiores em comparação às reações realizadas na ausência de enzimas <sup>67</sup>.

Portanto, com a grande importância das funções enzimáticas, estudos de interação com diferentes moléculas pequenas têm sido realizados a fim de analisar a manutenção ou inibição das propriedades da enzima <sup>96</sup>. Diversos estudos de interação com nanopartículas são realizados, em sua maioria, voltados para aumento da atividade catalítica em aplicações biotecnológicas ou na relação com as mudanças de conformação provocadas e o impacto nas funções da enzima visando aplicações biomédicas <sup>27, 97</sup>. Com isso, considerando a importância e as propriedades específicas das enzimas, o conhecimento sobre as interações envolvidas com é essencial para o desenvolvimento de novas tecnologias.

#### 1.4.2.1. Lipase de *Candida* sp. (CALB)

As lipases são encontradas em organismos vivos <sup>98</sup> e tem papel importante no metabolismo e hidrólise de gorduras <sup>99, 100</sup>. Elas são versáteis por catalisarem diversas reações como transesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise <sup>94, 99</sup>,

<sup>101-104</sup> e na hidrólise de triacilglicerídeos em glicerol e ácidos graxos <sup>98</sup>, sendo esta última muito visada na produção do biodiesel <sup>105</sup>.

A lipase de *Candida* sp. (CALB) é uma lipase bastante estudada e empregada, apresentando um grande número de patentes registradas para diversas aplicações <sup>98</sup>. A CALB é uma proteína monomérica a qual consiste de 317 resíduos de aminoácidos, com 5 resíduos de triptofano, massa molar de 33 kDa e seu ponto isoeletrico é 5,8 <sup>98, 106</sup>. O sítio catalítico da CALB é composto por uma tríade de resíduos de aminoácidos de serina (Ser), histidina (His) e um resíduo carboxílico de ácido aspártico ou glutâmico (Asp/Glu) <sup>98</sup>.

Diferente das outras lipases, a CALB não apresenta em sua estrutura a tampa hidrofóbica que recobre o sítio catalítico, fazendo com que fique mais disponível para o contato com o substrato <sup>98, 107</sup>. Portanto, esta característica favorece o uso da CALB como um eficiente catalisador, podendo ser aplicada tanto na hidrólise em meio aquoso como na esterificação em solventes orgânicos <sup>98, 108</sup>.

A mudança de conformação da CALB pode ser promovida, por exemplo, pela adsorção física em superfícies <sup>109</sup>. Diferentes métodos de adsorção são empregados a fim de alterar a estabilidade, atividade ou até mesmo enantiosseletividade da CALB <sup>109-112</sup>, como por exemplo, utilizando nanomateriais <sup>27</sup>. Por outro lado, a interação com nanomateriais também pode levar à desnaturação da CALB, dependendo da hidrofobicidade e do tamanho da superfície do nanomaterial <sup>109, 113</sup>. Portanto, o estudo da relação da conformação com a estabilidade e atividade da CALB na presença de nanomateriais, da mesma maneira com outras moléculas, é tão importante para aplicações biotecnológicas assim como biomédicas da CALB.

#### 1.4.2.2. Lisozima

A lisozima é uma proteína que tem capacidade de hidrolisar ligações (1→4) glicosídicas de carboidratos presentes na estrutura de paredes celulares. Está presente na clara de ovo de galinha (HEWL, do inglês *hen egg white lysozyme*) <sup>114</sup>. Devido à sua ação nas paredes celulares, tem característica bactericida, e também são encontrados trabalhos relatando sua atividade antitumoral, antifúngica e no combate do vírus HIV <sup>24, 114-118</sup>. Com isso, a lisozima é muito utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos <sup>114</sup>.



A lisozima, por ser muito abundante e bastante estudada, com estrutura e propriedades bem conhecidas, é uma enzima modelo para estudos de conformação, dinâmica e interações de proteínas <sup>24</sup>. A lisozima é uma enzima globular pequena com 129 resíduos de aminoácidos, com 6 resíduos de triptofano, massa molar de 14,3 kDa e seu ponto isoelétrico é 11,16 <sup>24, 114, 119</sup>. Além disso, uma das propriedades da lisozima que vem sendo muito investigada e de grande interesse, é na formação de estruturas de fibras amilóides <sup>120</sup>.

As fibras amilóides são estruturas do tipo folha- $\beta$ , formadas pela auto-montagem de agregados de proteína altamente ordenadas e são associadas com doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson <sup>121-123</sup>. Com a grande importância no estudo das fibras amilóides em busca de tratamentos para doenças degenerativas, a lisozima é uma enzima modelo para a investigação estrutural e dos mecanismos envolvidos <sup>120</sup>. Além disso, utilizar a lisozima como enzima modelo é muito interessante pois as proteínas que são diretamente associadas à essas doenças (por exemplo, peptídeo  $\beta$ -amilóide para Alzheimer <sup>124</sup> e  $\alpha$ -sinucleína para Parkinson <sup>125, 126</sup>) são muito caras e muitas vezes de difícil aquisição. Portanto, o estudo de doenças amilóides utilizando a lisozima ajuda a facilitar e acelerar as pesquisas com esse objetivo.

#### 1.4.2.3. Fibrilação de proteínas

Os agregados de proteína que formam as fibras amilóides são formados pelo desenovelamento de proteínas com a exposição de seus grupos hidrofóbicos <sup>123</sup>. É bem conhecido que o processo de fibrilação de proteínas ocorre em três fases e apresenta um perfil sigmoidal de formação <sup>127, 128</sup>, conforme ilustrada na FIGURA 9. Primeiro, há uma fase de atraso, onde a proteína com forma globular e estrutura  $\alpha$ -hélice é desenovelada e ocorre a nucleação das fibras para formar as estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas. Em seguida, na fase de crescimento ocorre as interações proteínas-proteínas para o crescimento das fibras amilóides, formando as estruturas chamadas de protofibrilas. Por último, na fase platô estável, o processo de fibrilação é completado e apresenta a maior quantidade de estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas obtidas.



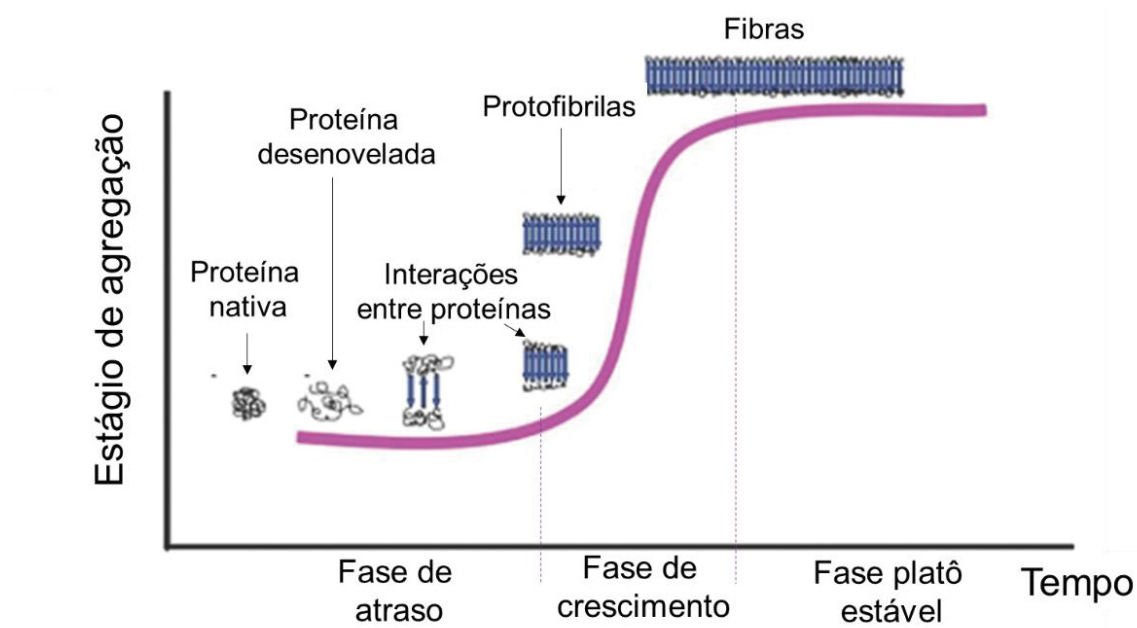


FIGURA 9. Esquema ilustrativo do processo de formação das fibras amilóides, apresentando os estágios de agregação. O perfil sigmoide consiste em uma primeira fase de atraso, seguida da fase de crescimento e, por último, a fase de platô estável. Fonte: adaptado com permissão de *Royal Society of Chemistry* <sup>123</sup>.

Diversas estratégias estão sendo desenvolvidas para controlar a fibrilação de proteínas. Em geral, as estratégias envolvem a adição de moléculas pequenas durante o processo de fibrilação, tais como vitaminas, polifenóis, flavonóides, metais quelantes e uma variedade de drogas <sup>124, 129-131</sup>. Além disso, há novas estratégias com a adição de proteínas ou peptídeos em competição com os fragmentos de fibras existentes <sup>122</sup>. Atualmente, o uso da nanotecnologia vem mostrando ser uma ferramenta atrativa no controle das fibras amilóides devido às suas propriedades distintas <sup>121, 128</sup>.

Além disso, um dos grandes desafios associados à formação das fibras amilóides não é apenas a prevenção ou interrupção da agregação de proteínas, mas, principalmente, a reversão do processo de desenovelamento e a retomada da conformação original das proteínas. No entanto, ainda é necessário conhecimento mais aprofundado para elucidar e controlar o processo de fibrilação e os mecanismos diferentes associados a este processo.

## 1.5. PRINCIPAIS TÉCNICAS EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES NA INTERFACE NANO-BIO

### 1.5.1. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia no UV-Vis é uma das técnicas mais comuns para diversos tipos de análises convencionais envolvendo as interações proteínas-nanopartículas <sup>132</sup>. Como por exemplo, na caracterização da banda SPR das AuNPs em torno de  $\lambda = 520$  nm e a detecção de proteínas pela banda de absorção em torno de  $\lambda = 280$  nm. Com isso, a espectroscopia no UV-Vis é uma técnica simples e rápida na caracterização das interações proteínas-AuNPs <sup>133</sup>.

A espectroscopia no UV-Vis consiste na absorção da luz ( $I_{\text{abs}}$ ) por uma determinada amostra quando sobre ela é incidido um feixe de radiação eletromagnética ( $I_0$ ). Neste processo, também pode haver uma fração de intensidade da luz refletida ( $I_{\text{ref}}$ ), espalhada ( $I_{\text{esp}}$ ) ou transmitida ( $I_{\text{trans}}$ ), conforme ilustrado na FIGURA 10. Portanto,  $I_0$  consiste na soma de todas estas frações de luz ( $I_0 = I_{\text{abs}} + I_{\text{ref}} + I_{\text{esp}} + I_{\text{trans}}$ ) <sup>91</sup>. Para eliminar os efeitos de  $I_{\text{ref}}$  e  $I_{\text{esp}}$ , nas medidas de absorção no UV-Vis, geralmente é feito o desconto da absorção do solvente na mesma região, conhecido como linha base ou branco da amostra <sup>91</sup>. Desta forma, a detecção da luz absorvida é determinada por  $I_{\text{abs}} = I_0 - I_{\text{trans}}$ , a qual dá origem a lei de Lambert-Beer, conhecida como  $A = -\log I_{\text{trans}}/I_0 = \varepsilon lC$ , onde a  $A$  é a absorbância,  $\varepsilon$  o coeficiente de absorção molar,  $l$  é o caminho óptico da cubeta e  $C$  a concentração molar da amostra.

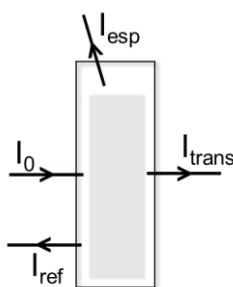


FIGURA 10. Esquema ilustrativo de um feixe de luz eletromagnético incidente ( $I_0$ ), em uma cubeta contendo a amostra, o qual pode ser transmitido ( $I_{\text{trans}}$ ), espalhado ( $I_{\text{esp}}$ ) ou refletido ( $I_{\text{ref}}$ ) pela da interação com as partículas da amostra. Fonte: adaptado de <sup>91</sup>.

Em um espectro por absorção no UV-Vis, as mudanças observadas no deslocamento, alargamento e intensidade das bandas são as ferramentas mais

utilizadas para caracterizações qualitativas das interações nano-bio <sup>132</sup>. Deslocamentos pequenos de  $\lambda$  no UV-Vis de em torno 5 nm foram significativos para confirmar a adsorção de proteínas em AuNPs e em nanopartículas de prata (AgNPs) <sup>134</sup>. Além disso, as mudanças observadas no espectro de absorção de materiais híbridos nano-bio foram associadas com o seu aumento de tamanho, comparado com as partículas isoladas, para justificar as contribuições no espalhamento de luz do espectro <sup>133</sup>.

De maneira interessante, a interação nano-bio entre AuNPs e tripsina foi caracterizada por bandas de absorção diferentes no espectro UV-Vis em trabalhos distintos. No primeiro, o deslocamento para o vermelho da banda em  $\lambda = 210$  nm referente a tripsina sugeriu que as AuNPs afetaram a estabilidade da proteína e, ao mesmo tempo, o aumento da absorção de outra banda referente a tripsina em  $\lambda = 276$  nm indicou a formação do complexo AuNPs-tripsina <sup>135</sup>. Por outro lado, no segundo trabalho, a adsorção de tripsina em AuNPs foi caracterizada pelo monitorando dos desvios da banda SPR das AuNPs para  $\lambda$  maiores <sup>136</sup>. Portanto, a espectroscopia no UV-Vis é uma técnica importante na caracterização da interação nano-bio, somado ainda pela vantagem em não haver sobreposição das respectivas bandas, facilitando a identificação dos processos em diferentes regiões do espectro.

#### 1.5.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica eficiente muito utilizada na caracterização da estrutura terciária de proteínas por ser sensível às mudanças de conformação pela interação com outras moléculas pequenas como as nanopartículas <sup>137</sup>. O processo de fluorescência ocorre pela emissão de fótons, os quais são gerados na excitação eletrônica de átomos ou moléculas ao retornarem à um estado de menor energia <sup>138</sup>, como ilustrado na FIGURA 11. A interação com outras moléculas pode alterar a emissão dos fótons das moléculas de proteínas e, consequentemente, o espectro de emissão adquirido.

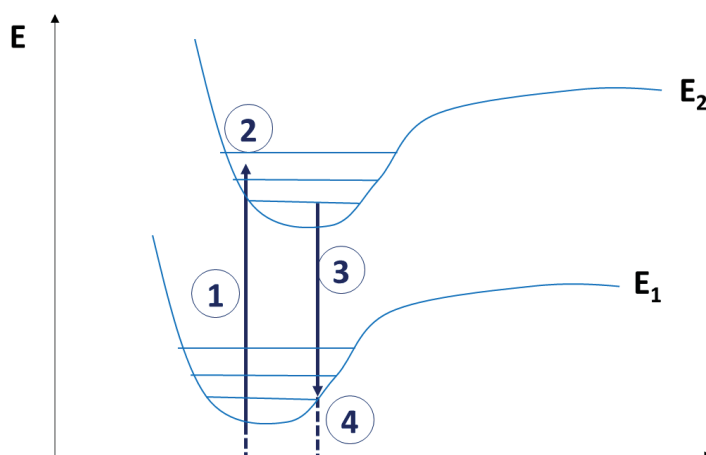


FIGURA 11. Esquema ilustrativo dos níveis de energia de uma molécula. O processo de emissão de fótons ocorre pela (1) excitação eletrônica com a absorção da luz, (2) atingindo um estado eletrônico excitado, seguido da (3) emissão fluorescente e (4) da relaxação ao retornar à um estado eletrônico de menor energia. Fonte: adaptado de <sup>138</sup>.

Em um espectro de emissão de fluorescência, as alterações observadas no comprimento de onda máximo emitido ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e na intensidade de fluorescência fornecem informações sobre interações e mudanças no meio. Em relação à intensidade de fluorescência, partículas que absorvem no mesmo  $\lambda$  de excitação podem atenuar o espectro de emissão de fluorescência adquirido <sup>139</sup>. Nestes casos, pode haver a diminuição na intensidade de fluorescência promovida pelo aumento da absorção da amostra <sup>140</sup>. Para corrigir esse efeito, a correção de filtro interno é aplicada a fim de minimizar a contribuição da absorção no espectro de emissão de fluorescência final <sup>140</sup>. Essa correção deve ser feita quando a absorção da amostra exceder o valor de 0,05, no mesmo  $\lambda$  de excitação na fluorescência, para a obtenção de um espectro de fluorescência “real” da amostra <sup>139</sup>. Nestes casos, a fluorescência adquirida ( $F_0$ ) é corrigida ( $F$ ) utilizando a correção do filtro interno demonstrada pela equação 1 descrita anteriormente <sup>141</sup>:

$$F = F_0 \cdot 10^{(A_{\text{ex}} \cdot l_{\text{ex}})} \cdot 10^{(A_{\text{em}} l_{\text{em}})} \quad (\text{equação 1})$$

a qual relaciona a absorbância da amostra no mesmo  $\lambda$  de excitação ( $A_{\text{ex}}$ ) e emissão ( $A_{\text{em}}$ ) e os correspondentes caminhos ópticos ( $l_{\text{ex}}$  e  $l_{\text{em}}$ ). A FIGURA 12 apresenta um esquema ilustrativo do caminho óptico percorrido pela luz em uma cubeta em função do  $\lambda$  excitado e emitido em um fluorímetro, onde estão identificados os termos utilizados na correção do filtro interno. O feixe incidente excita a molécula em um  $\lambda_{\text{exc}}$  definido (por exemplo,  $\lambda = 295$  nm para o triptofano)

e absorvido no  $\lambda$  correspondente, enquanto que o feixe de luz de emissão  $\lambda_{em}$  é absorvido conforme o espectro de emissão adquirido (por exemplo,  $\lambda = 305 - 500$  nm para o triptofano) <sup>140</sup>. O fluorímetro apresenta uma geometria como “formato L” para evitar a detecção simultânea da luz excitada e emitida <sup>138</sup>.

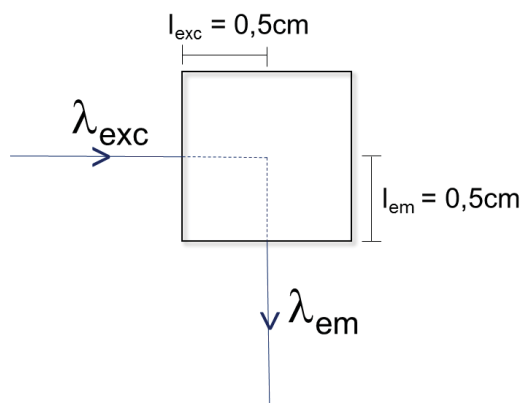


FIGURA 12. Esquema ilustrativo da luz percorrida em uma cubeta de caminho óptico 1 cm x 1 cm em um fluorímetro. O feixe de luz de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) atinge o centro da cubeta e é emitido ( $\lambda_{em}$ ) na forma de um ângulo de 90°.

O espectro de fluorescência de proteínas se dá pela excitação dos resíduos de aminoácidos aromáticos. Apenas três dos vinte aminoácidos encontrados em proteínas apresentam fluorescência quando excitados na região ultravioleta <sup>138</sup>. Os resíduos de aminoácidos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) apresentam máximos de absorção em torno de 250, 275 e 280 nm e são caracterizados no espectro de fluorescência em torno de 280, 305 e 350 nm, respectivamente (em meio aquoso) <sup>138</sup>. A FIGURA 13 apresenta os espectros de absorção e de fluorescência da Phe, Tyr e Trp assim como as suas respectivas estruturas moleculares.

Entre eles, em geral o comportamento do Trp é o mais utilizado apesar de ser encontrado em menor quantidade nas proteínas do que a Phe e a Tyr <sup>138</sup>. Como o Trp pode ser excitado seletivamente acima de  $\lambda = 295$  nm, evita a contribuição da emissão da Phe e Tyr <sup>138</sup>. Por este motivo, a excitação do Trp não é feita em seu máximo de absorção ( $\lambda_{max} = 280$  nm) a fim de evitar essa interferência. Além disso, o Trp é o mais interessante pois apresenta rendimento quântico ( $\Phi$ ) satisfatoriamente maior ( $\Phi = 0,13$ ) ao da Phe ( $\Phi = 0,05$ ). Porém, apesar de ter  $\Phi$  ligeiramente menor do que a Tyr ( $\Phi = 0,14$ ), ainda é mais interessante acompanhar o Trp devido a sua excitação seletiva em  $\lambda = 295$  nm.

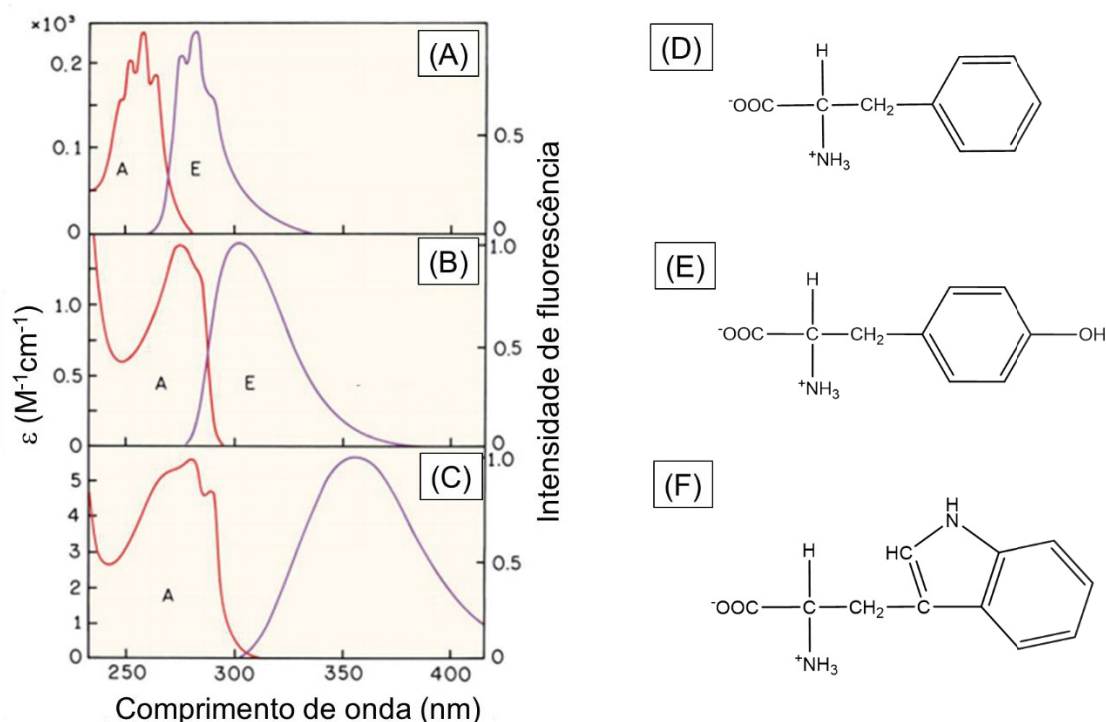


FIGURA 13. Espectros de absorção (curva vermelha) e emissão de fluorescência (curva roxa) dos resíduos de aminoácido (A) fenilalanina (Phe), (B) tirosina (Tyr), (C) triptofano (Trp) e suas respectivas estruturas moleculares em (D), (E) e (F) (em meio aquoso). Fonte: adaptado de <sup>142</sup>.

O espectro de fluorescência de Trp é muito sensível às mudanças do meio e interações com proteínas. Em meio aquoso, o Trp está preferencialmente localizado no interior da estrutura da proteína devido ao seu caráter hidrofóbico <sup>138</sup>. A exposição dos resíduos de Trp ao meio leva ao deslocamento para  $\lambda$  maiores. Logo, o deslocamento de  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp fornece informações importantes sobre as mudanças de conformação da proteína.

Por outro lado, processos sem o deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp e com diminuição da intensidade de fluorescência, sugerem que não houve mudanças de conformação significativas na proteína <sup>143</sup>. Esse tipo de comportamento é associado aos processos de interação da proteína com moléculas pequenas, conhecido como supressão da fluorescência <sup>144, 145</sup>. Como por exemplo, este comportamento foi observado para a albumina de soro humano (HSA) na presença de nanopartículas de prata (AgNPs), onde foram obtidos parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação HSA-AgNPs <sup>143</sup>.

Além disso, sondas fluorescentes podem ser empregadas para interagir com estruturas específicas da proteína. Em geral, são utilizadas moléculas cromóforas

com  $\lambda_{em}$  e  $\lambda_{exc}$  maiores do que os dos aminoácidos presentes na estrutura da proteína <sup>142</sup>. Como por exemplo, a Tioflavina T (ThT) que apresenta aumento expressivo de sua fluorescência quando ligada às estruturas do tipo folhas  $\beta$ -pregueadas encontradas em proteínas amilóides <sup>144</sup>. A fluorescência da ThT na ausência desse tipo de estrutura é significativamente menor ou nula <sup>146</sup>.

### 1.5.3. Espectroscopia de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma técnica muito eficiente para a caracterização da estrutura secundária de proteínas em solução assim como para analisar as interações com outras moléculas <sup>147, 148</sup>. A obtenção de um espectro no espectrômetro de CD ocorre pela diferença das absorbâncias da luz plano polarizada ao atingir a amostra <sup>148</sup>. Em geral, a luz plano polarizada pode ser dividida em duas componentes principais de polarização circular de mesma magnitude, onde uma polariza circularmente no sentido horário (R) e outra no sentido anti-horário (L) e, quando combinadas, geram a uma resultante de radiação de luz plano polarizada, conforme esquematizado na FIGURA 14. Dessa forma, se ao incidir a amostra, a luz não for absorvida ou se as componentes forem absorvidas com a mesma magnitude, não é detectado uma resultante de luz polarizada pelo equipamento (FIGURA 14(A)). Por outro lado, quando as componentes apresentarem magnitudes diferentes ao incidir a amostra, a resultante das componentes R e S é polarizada na forma de uma elipse (FIGURA 14(B)). Normalmente, o espectro de CD é apresentado em termos da elipticidade ( $\theta$ ) em função do comprimento de onda.

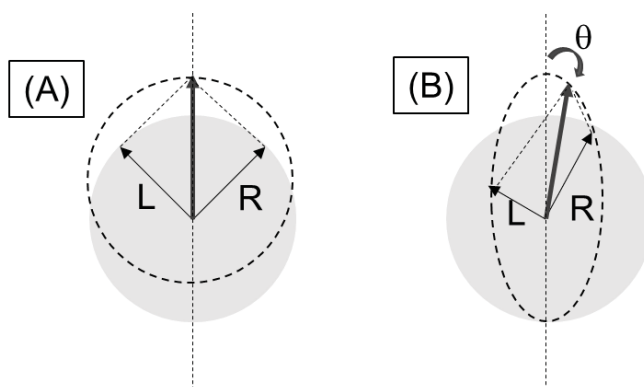


FIGURA 14. Esquema representativo das componentes R (sentido horário) e L (sentido anti-horário) da luz plano polarizada e a sua resultante ao incidir uma amostra em espectrofotômetro de CD. As componentes R e L (A) com a mesma magnitude não tem a sua resultante detectada pelo equipamento e (B) com diferentes magnitudes a resultante é polarizada elipticamente com um ângulo  $\theta$ . Fonte: adaptado de <sup>148</sup>.

Dessa forma, são as moléculas quirais não racêmicas que apresentam sinal no CD, como por exemplo, as proteínas <sup>148</sup>. As proteínas podem ser caracterizadas em diferentes regiões em um espectro de CD. As ligações peptídicas apresentam absorção abaixo de 240 nm, as frações aromáticas dos aminoácidos entre 260 nm e 320 nm e as ligações de dissulfetos apresentam uma absorção fraca e larga próximo de 260 nm <sup>148</sup>. A absorção na região das ligações peptídicas (240 nm e abaixo) fornecem informações sobre a composição da estrutura secundária das proteínas <sup>56</sup>. Como por exemplo, as estruturas  $\alpha$ -hélice apresentam dois sinais negativos característicos em 208 nm e 222 nm, as folhas  $\beta$ -pregueadas apresentam sinal positivo em 205 nm associado ao sinal negativo e largo ao redor de 225 nm, estruturas irregulares apresentam sinal negativo acentuado ao redor de 200 nm, conforme apresentado nos espectros de CD na FIGURA 15 referentes as principais estruturas secundárias encontradas nas proteínas.

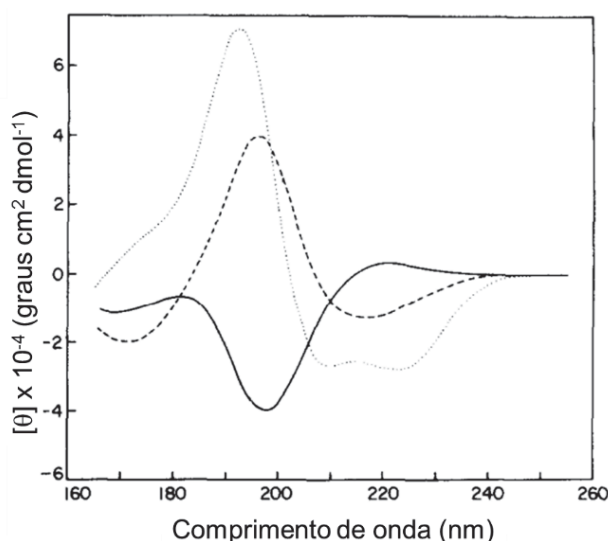


FIGURA 15. Espectros de CD de proteínas com estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélice (.....), folhas  $\beta$ -pregueadas (-----) e estruturas desordenadas (-). Fonte: adaptado com permissão de *Elsevier* <sup>149</sup>.

Pelo espectro de CD, além de obter as informações qualitativas a respeito da estrutura secundária, também é possível caracterizar quantitativamente a estrutura secundária das proteínas. Com por exemplo, as mudanças da elipticidade no sinal obtido em 222 nm, em função da adição de outras moléculas, são utilizadas para monitorar as mudanças de conformação e processos de desenovelamento <sup>148, 150, 151</sup>. Além disso, também é possível obter informações sobre as mudanças conformacionais das proteínas provocadas pela temperatura ou adição de agentes



desnaturantes <sup>150, 151</sup>. A técnica de CD tem se mostrado como uma ótima ferramenta para caracterizar as interações entre proteínas e as AuNPs <sup>152-154</sup>.

#### 1.5.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica robusta para a investigação da interação de proteínas com nanopartículas através do monitoramento das mudanças de calor geradas nesse processo <sup>155, 156</sup>. Pela análise dos resultados obtidos por ITC são determinados dados qualitativos e quantitativos da termodinâmica e cinética das reações <sup>155</sup>. Como por exemplo, pode ser determinado quão forte uma molécula se liga à um sítio de interação específico ou quão rápido uma reação pode acontecer <sup>157</sup>. Com isso, as informações relevantes adquiridas pela análise por ITC ajudam na identificação das principais forças envolvidas nas interações entre nanopartículas e biomoléculas <sup>2</sup>.

Pelo monitoramento das mudanças de calor envolvidas na interação entre nanopartículas e biomoléculas, podem ser obtidos parâmetros termodinâmicos relacionados à estequiometria, constante de ligação, entalpia, energia livre e entropia desses sistemas <sup>2, 155</sup>. Além disso, a partir da relação desses parâmetros são obtidas informações sobre as forças motrizes e de afinidade que auxiliam na elucidação dos mecanismos de interação nesses processos <sup>2</sup>. Como por exemplo, são encontrados trabalhos empregando a técnica de ITC no estudo das interações preferencias entre proteínas e nanopartículas funcionalizadas, na formação da coroa de proteínas e até mesmo na elucidação de interações querais de nanopartículas <sup>21, 156, 158</sup>.

A FIGURA 16 apresenta um esquema ilustrativo de um equipamento de ITC típico. De maneira simplificada, o equipamento consiste de um sistema adiabático contendo uma cela de referência e outra cela de medida onde a amostra é titulada por uma seringa e a reação acontece. A mudança de calor durante a titulação é monitorada pela energia necessária para manter a temperatura constante da cela de medida em relação à cela de referência <sup>157</sup>. Em seguida, esse dado bruto obtido em  $\text{cals}^{-1}$  ou  $\text{Js}^{-1}$  pode ser relacionado com a mudança de calor em função da razão biomolécula/nanopartícula no decorrer da titulação <sup>157</sup>. A mudança de calor observada pode ser originada pelo monitoramento do calor perdido (processo exotérmico) ou absorvido (processo endotérmico) durante a interação nano-bio <sup>155</sup>.

Com o progresso da titulação, o calor da reação tende à zero devido aos sítios de interação começarem a ficar saturados.

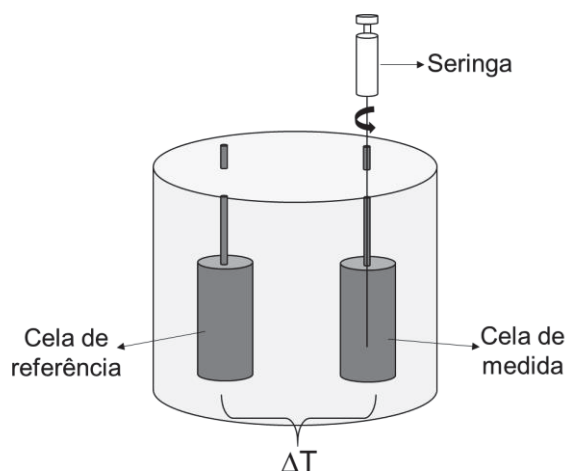


FIGURA 16. Esquema ilustrativo de um equipamento de ITC. A mudança de calor é monitorada pela energia necessária para manter a temperatura constante ( $\Delta T$ ) da cela de medida em relação à cela de referência.

Entretanto, alguns cuidados devem ser tomados para os procedimentos experimentais e análises dos dados obtidos por ITC. A concentração da amostra na seringa (geralmente, a dispersão de biomoléculas) deve ser pelo menos 10 vezes maior do que a da amostra na cela (geralmente, a dispersão de nanopartículas) a fim de haver quantidade suficiente de ligantes para os sítios de ligação disponíveis <sup>2</sup>. É necessário saber a concentração exata dos componentes além dos mesmos parâmetros químicos de ambas as dispersões (pH, solução tampão, concentração de sal) para uma avaliação mais verdadeira dos parâmetros obtidos <sup>157</sup>. Por último, é primordial a análise e desconto das contribuições na mudança de calor atreladas ao solvente ou outras espécies presentes no meio <sup>155</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliação das interações entre nanopartículas de ouro esféricas e na forma de bastões, obtidas por diferentes tipos de síntese química, com biomoléculas (goma arábica, quitosana sulfatada, lipase de *Candida* sp. (CALB) e lisozima) a fim de realizar um estudo físico-químico dos fenômenos que ocorrem na interface nano-bio.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da goma arábica, quitosana sulfatada e CALB como agentes de estabilização para nanopartículas de ouro;
- Avaliação das mudanças de conformação e atividade catalítica provocadas na CALB pelas interações com as AuNPs;
- Estudo da influência das AuNPs no processo de fibrilação da lisozima e as interações com a lisozima globular e fibrilar.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAIS

Todas as amostras foram preparadas utilizando água de grau Milli-Q (18,2 MΩcm, Millipore, USA).

#### 3.1.1. Goma arábica (GA)

A GA (Sigma-Aldrich, G9752) é de origem das espécies *Acacia seyal* e *Acacia senegal*, descrita como “goma arábica proveniente de árvore de acácia”. Antes do seu uso, a GA foi solubilizada em água, permanecendo na geladeira por um período 12 horas e, em seguida, foi dialisada contra água durante 48 horas utilizando uma membrana de diálise com tamanho de 12-14 kDa e, por último, a GA foi liofilizada. A GA apresentou massa molar média ( $M_w$ ) de  $9,3 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  <sup>72</sup>.

#### 3.1.2. Quitosana sulfatada (ChiS)

A quitosana sulfatada (ChiS) foi fornecida pelo grupo de pesquisa do Professor Guilherme Sassaki do Departamento de Bioquímica/UFPR. A quitosana comercial foi submetida ao processo de sulfatação utilizando o método de ácido sulfúrico/ácido clorosulfônico <sup>87</sup>. Para isso, 1g da quitosana comercial (Sigma-

Aldrich) foi adicionada à mistura reacional, previamente resfriada a 4°C, contendo 40 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95%) e 20 mL de ácido clorosulfurônico (HClSO<sub>3</sub>, 98%). Em seguida, a mistura reacional foi mantida sob agitação durante 1 hora em temperatura ambiente. O processo de sulfatação foi interrompido adicionando 250 mL de éter dietílico (Et<sub>2</sub>O) resfriado à mistura reacional. O precipitado formado foi lavado com Et<sub>2</sub>O resfriado, dissolvido em água, neutralizado com NaHCO<sub>3</sub> saturado, dialisado contra água utilizando uma membrana com tamanho de 3500 kDa e, por último, liofilizado. A ChiS apresentou  $M_w = 1,4 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ , contendo 48% de grupos SO<sub>4</sub> (6,8% e 41,2% de grupos SO<sub>3</sub> nas posições O-3 e O-6, respectivamente) em sua estrutura.

### 3.1.3. Lipase de *Candida* sp. CALB

A lipase de *Candida* sp. (CALB) (Sigma-Aldrich, L3170) foi utilizada sem nenhuma purificação prévia. Para os experimentos, o extrato de CALB foi diluído em água com concentração final de 0,1 % (v/v), o que corresponde a 0,42  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração da CALB em dispersão foi determinada considerando a massa molar de 33 kDa<sup>98</sup> e a concentração de proteínas de 14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , determinado pelo método de Bradford<sup>159</sup>.

### 3.1.4. Lisozima

Foi utilizada lisozima de origem de clara de ovo de galinha (HEWL, do inglês, *hen egg white lysozyme*) (Sigma-Aldrich) liofilizado, sem purificação prévia. A quantidade de proteína é  $\geq 90 \%$  (informação fornecida no rótulo do produto). A massa molar da lisozima é 14,3 kDa.

## 3.2. PROCEDIMENTOS

### 3.2.1. Síntese dos nanobastões de ouro (AuNRs)

Os nanobastões de ouro (AuNRs) utilizados neste estudo foram fornecidos pelo grupo de pesquisa do Professor Mario Meneghetti do Instituto de Química e Biotecnologia/UFAL. Os AuNRs foram sintetizados utilizando o método *seed-mediated* de acordo com método anteriormente descrito<sup>160, 161</sup>. Primeiramente, foi preparada a solução conhecida como *seed* utilizando 5 mL de solução aquosa de HAuCl<sub>4</sub> 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e 2,5 mL de solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, foi adicionado 0,6 mL de NaBH<sub>4</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> resfriado. A

coloração da dispersão mudou imediatamente de amarelo escuro para marrom. A dispersão foi mantida sob agitação branda durante 2 minutos e foi utilizada para síntese após 2 horas de repouso. Em seguida, a solução conhecida como *growth solution* foi preparada utilizando 2,5 mL de CTAB  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , 5 mL de solução aquosa de  $\text{HAuCl}_4$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e 150  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$   $4 \text{ mmol L}^{-1}$ , mantidos sob agitação magnética branda. 70  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico  $80 \text{ mmol L}^{-1}$  foram adicionados e a coloração da dispersão mudou imediatamente de amarelo escuro para incolor. Por último, 12  $\mu\text{L}$  da solução *seed* foram adicionados e a dispersão foi mantida sob agitação magnética branda durante 10 segundos. A coloração da mistura reacional mudou lentamente de incolor para roxo. A dispersão final foi deixada em repouso por pelo menos 4 horas para a formação dos AuNRs. A concentração final dos AuNRs na dispersão foi de  $50 \text{ nmol L}^{-1}$  e equivalente à  $3,0 \times 10^{14}$  partículas  $\text{L}^{-1}$ , determinado por ICP-OES.

### 3.2.2. Preparação da GA@AuNRs e ChiS@AuNRs

Os AuNRs estabilizados por polissacarídeos, tanto os GA-AuNRs como os ChiS-AuNRs, foram preparados por um método simples descrito a seguir. Primeiramente, os AuNRs foram centrifugados (10.000 rpm, por 15 minutos) e o sobrenadante foi descartado para remover o excesso de CTAB. O precipitado foi disperso em 0,5 mL de água. Em seguida, foi adicionado 4,5 mL de solução de GA ou ChiS 0,1% (m/v). A dispersão final foi deixada sob agitação magnética branda em temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas. Por último, as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado para remover o excesso de GA ou ChiS que não foram adsorvidas na superfície dos AuNRs. O precipitado resultante foi disperso em 2 mL de água e, em seguida, caracterizado.

### 3.2.3. Síntese AuNPs estabilizadas por citrato

A síntese das AuNPs foi adaptada de uma metodologia descrita anteriormente <sup>162</sup>. Primeiro, foi preparada uma solução redutora contendo 15 mL de solução recém-preparada de citrato de sódio  $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$ , 5  $\mu\text{L}$  de ácido tânico  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $150 \text{ mmol L}^{-1}$ , mantida sob agitação magnética a  $70^\circ\text{C}$ . Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$   $25 \text{ mmol L}^{-1}$  foram adicionados ao meio

reacional e imediatamente a cor da dispersão mudou de transparente para roxo. Esta dispersão foi mantida sob agitação magnética a 70°C durante 10 minutos. A concentração final de AuNPs na dispersão foi de 4,7 nmol L<sup>-1</sup> e equivalente à 2,8 x 10<sup>15</sup> partículas L<sup>-1</sup>, determinado por ICP-OES.

#### 3.2.4. Síntese AuNPs utilizando a CALB como agente estabilizante (SA-CALB@AuNPs)

A síntese da SA-CALB@AuNPs foi adaptada de uma metodologia descrita anteriormente <sup>39</sup>. Em um meio reacional contendo 1,5 mL de HAuCl<sub>4</sub> 1,74 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de água, mantido sob agitação magnética a 25°C, 3,72 mL de CALB 0,1 % (v/v) foram adicionados. Em seguida, 0,72 mL da solução fresca e fria do agente redutor NaBH<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup> foi adicionado de uma vez. A dispersão foi mantida sob agitação magnética a 25°C durante 30 minutos. A concentração final de AuNPs foi de 2,0 nmol L<sup>-1</sup> e equivalente à 1,2 x 10<sup>15</sup> partículas L<sup>-1</sup>, determinado por ICP-OES.

#### 3.2.5. Adsorção da CALB na superfície das AuNPs (CALB@AuNPs)

Para obter as CALB@AuNPs, 2 mL de CALB 0,1% foi adicionada em 2 mL de AuNPs estabilizadas por citrato previamente preparadas 2,6 x 10<sup>-9</sup> mol L<sup>-1</sup>. A dispersão foi mantida sob agitação magnética a 25°C durante 30 minutos para assegurar a completa adsorção da CALB na superfície das AuNPs. A concentração final de AuNPs foi de 1,3 nmol L<sup>-1</sup> e equivalente à 7,8 x 10<sup>14</sup> partículas L<sup>-1</sup>, determinado por ICP-OES.

#### 3.2.6. Síntese AuNPs estabilizadas por MPA

A síntese das AuNPs foi adaptada de um método descrito anteriormente <sup>39, 163</sup>. Em 10 mL de HAuCl<sub>4</sub> 0,0875 mmol L<sup>-1</sup> foram adicionados 2,4 mL da solução recém-preparada e gelada do agente redutor NaBH<sub>4</sub> 1 mmol L<sup>-1</sup>. A dispersão foi mantida sob agitação magnética a 25°C durante 20 minutos. Em seguida, 100 µL do ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) 10 mmol L<sup>-1</sup> foram adicionados na dispersão das AuNPs, e mantida sob agitação magnética durante 30 minutos. Por último, a dispersão final foi centrifugada a 14000 rpm durante 3 horas para remover o excesso de MPA e o precipitado foi lavado e disperso em 1 mL de água. A

concentração final de ouro na dispersão foi de 33,8 mg L<sup>-1</sup>, determinado por ICP-OES.

### 3.2.7. Fibrilação da lisozima

A solução de lisozima de concentração 2 mg mL<sup>-1</sup> foi preparada em tampão PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mmol L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 140 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 mmol L<sup>-1</sup>) em pH 7,3. A concentração da lisozima foi determinada pela absorbância em 280 nm utilizando o coeficiente de extinção de  $\epsilon = 38940 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  <sup>164, 165</sup>. Para produzir as fibras, o pH da solução foi ajustado para 2,0 adicionando HCl e, em seguida, a dispersão foi mantida sob agitação a 500 rpm por 60°C *overnight* em um ThermoMixer (HLC, MKR23). Diferentes quantidades de AuNPs foram adicionadas na dispersão de lisozima antes de iniciar a fibrilação, com concentrações finais de 0,07, 0,3 e 3,1 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.2.8. Determinação da atividade enzimática pela reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP)

A atividade enzimática da CALB, CALB@AuNPs e *s*A CALB@AuNPs foi determinada segundo método proposto anteriormente <sup>95, 101</sup>. A solução de pNPP 0,5 mmol L<sup>-1</sup> foi preparada em isopropanol. Em uma cubeta de quartzo contendo 2,6 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 140 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 27 mmol L<sup>-1</sup>, 10 mmol L<sup>-1</sup> tampão fosfato; pH 7), foi adicionado 0,2 mL de solução de pNPP. A solução foi homogeneizada por inversão e, em seguida, 0,2 mL das dispersões de CALB, *s*A CALB@AuNP ou CALB@AuNPs foram adicionadas e a solução na cubeta foi novamente homogeneizada por imersão. A formação do produto *p*-nitrofenolato (pNP) de coloração amarelada foi monitorada por espectroscopia no UV-Vis, acompanhando o aumento da absorbância em  $\lambda = 405 \text{ nm}$  em função do tempo. Em todas as medidas, no primeiro ponto da curva adquirido não havia a presença da CALB. As cinéticas foram realizadas à 37°C, mantido com banho termostático acoplado ao espectrofotômetro UV-Vis, utilizando um espectrômetro Shimadzu UV PC2501, no Departamento de Química/UFPR.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO

#### 3.3.1. Quantificação de ouro por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)

As quantificações de ouro por ICP-OES foram obtidas a partir de uma curva analítica com diferentes concentrações de ouro como padrão. As concentrações de ouro são obtidas em  $\text{mgL}^{-1}$ . Para determinar a concentração de AuNPs em solução, foi utilizado a concentração de ouro obtida por ICP-OES e o diâmetro das AuNPs determinado pela análise das imagens de MET pelo *software Image J*. Para as AuNPs esféricas, o volume foi determinado de acordo com  $V = 4/3\pi R^3$ , onde  $R$  é o raio médio da AuNPs. Para os AuNRs, o volume foi determinado de acordo com  $V = \pi R^2 l$ , onde  $R$  é o raio médio da largura dos AuNRs e  $l$  é o comprimento médio dos AuNRs. A concentração de AuNPs foi calculada utilizando a densidade do ouro ( $19,3 \text{ g cm}^{-3}$ ), o número de Avogrado e a concentração do ouro determinado por ICP-OES<sup>166</sup>. A concentração de AuNPs obtidas em  $\text{mol L}^{-1}$  foi relacionada com o número de Avogrado para a determinação da concentração em partículas  $\text{L}^{-1}$  das AuNPs. As medidas das AuNPs estabilizadas por citrato, as  $\text{SA-CALB@AuNPs}$  e as  $\text{CALB@AuNPs}$  foram realizadas utilizando um espectrômetro Thermo Scientific iCAP 6000 series ICP-OES, no Departamento de Química (DQUI) na Universidade Federal do Paraná (UFPR) e as AuNPs-MPA foram realizadas utilizando um espectrômetro Horiba Jobin Yvon DS 500, no Max Planck *Institute for Polymer Research* (MPIP).

#### 3.3.2. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

O comportamento dos AuNRs e das AuNPs foram acompanhados por espectroscopia UV-Vis, monitorando o perfil de absorção das bandas plasmônicas em torno de  $\lambda_1 = 520$  e  $\lambda_2 = 740$  nm referente às bandas SPR dos AuNRs e em torno de  $\lambda = 520 - 540$  nm referente às AuNPs. As medidas foram feitas em solução aquosa utilizando espectrômetro UV-Vis Agilent 8453, no DQUI/UFPR e as AuNPs-MPA utilizando um leitor de placas Tecan infinite M1000 no MPIP.

#### 3.3.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para as amostras utilizadas no estudo com os AuNRs, uma gota das amostras ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ) foram depositadas em grades de cobre revestidas com carbono



e deixadas secar ao ar. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 80 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica - CME/UFPR.

Para as amostras utilizadas no estudo com a CALB, uma gota das amostras ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ) foi embebida em uma matriz do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio (EMI-BF<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), depositada em grades de cobre revestidas com carbono, retirando o excesso da amostra com papel filtro e deixada secar ao ar. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 120 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica - CME/UFPR. Para a imagem da amostra obtida por MET de alta resolução, uma alíquota de  $\sim 10 \mu\text{L}$ ) foi depositada em grade de cobre *lacey carbon*, deixada secar ao ar e as imagens foram obtidas utilizando um microscópio JEOL 2100 TEM-FEG, operando a 200 kV, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia Brasileiro –LNNano/CNPEN.

Para as amostras utilizadas no estudo da fibrilação da lisozima, uma gota das amostras ( $\sim 10 \mu\text{L}$ ) foi embebida em uma matriz de EMI-BF<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), depositada em grades de cobre *lacey carbon*, retirando o excesso das amostras com papel filtro e deixada secar ao ar. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de alta resolução FEI Tecnai F20, operando a 200 kV, no MPIP. Para a tomografia, séries de inclinações foram obtidas de  $-65^\circ$  à  $+65^\circ$ . Os alinhamentos e a média das sobreposições para as reconstruções 3D foram computadas utilizando o *software eTomo*.

O tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas foram determinados utilizando o *software ImageJ*.

#### 3.3.4. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-HR)

Alíquotas de  $\sim 10 \mu\text{L}$  das amostras foram depositadas em suporte para a amostra revestido com fita de cobre. Em seguida, a amostra foi seca em estufa à  $40^\circ\text{C}$ . Este procedimento foi repetido 3 vezes para formar um filme de amostra mais espesso. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio FEI Quanta 450 FEG, operando a 1,5 kV, no Centro de Microscopia Eletrônica - CME/UFPR.

#### 3.3.5. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Pastilhas de KBr foram preparadas com aproximadamente 1,5 mg das amostras em pó previamente secas sob pressão reduzida em dessecador. As medidas foram obtidas em modo de transmissão em um domínio espectral de 400

a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , utilizando um espectrômetro FTIR BIORAD FTS-3500 GX, no DQUI/UFPR.

### 3.3.6. Potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram obtidas pelo deslocamento eletroforético ( $U_E$ ) e convertidas para o valor de potencial zeta pela equação de Henry (equação 2):

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{equação 2})$$

onde,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio,  $\zeta$  é o potencial zeta (mV),  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $f(ka)$  é a função de Henry, a qual foi calculada pela aproximação de Smoluchowski ( $f(ka) = 1,5$ ). Os valores de potencial zeta foram obtidos pela média de 5 medidas. As medidas foram feitas em um equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90, no Instituto de Física/USP.

### 3.3.7. Eletroforese em gel

Para as amostras contendo lisozima, as eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida (PAGE). Uma alíquota das amostras foi misturada com amostra tampão NuPAGE LDS e amostra de agente de redução NuPAGE e aplicados em um gel NuPAGE 10% Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida NuPAGE MES SDS à 100V por 2 horas com o marcador molecular SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). O gel foi corado utilizando SimplyBlue SafeStain (Thermo Fisher Scientific). As análises foram contendo CALB foram realizadas no Departamento de Bioquímica/UFPR e as contendo lisozima foram feitas no MPIP.

### 3.3.8. Espectrofotometria de fluorescência

Para as medidas de fluorescência do triptofano (Trp) das amostras contendo CALB, o Trp foi excitado em 295 nm, o espectro de emissão foi obtido na faixa entre 305 a 500 nm, com abertura das fendas de emissão e excitação de 5 nm, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 4 x 10 mm. Como as AuNPs aumentaram a turbidez das dispersões de CALB, as intensidades de fluorescência de todos os espectros foram ajustadas pela correção do filtro interno utilizando a equação 1<sup>141</sup>:

$$F = F_0 \cdot 10^{(A_{ex} \cdot l_{ex})} \cdot 10^{(A_{em} \cdot l_{em})} \quad (\text{equação 1})$$

onde,  $F$  e  $F_0$  são as fluorescências corrigida e adquirida, respectivamente,  $A_{ex}$  e  $A_{em}$  são as absorbâncias adquiridas no  $\lambda$  de excitação e emissão, respectivamente,  $l_{ex}$  e  $l_{em}$  são os caminhos ópticos em centímetros. Para este trabalho, foram utilizados os seguintes valores para a correção do filtro interno:  $A_{ex}$  = 295 nm,  $A_{em}$  = 305 – 500 nm,  $l_{ex}$  = 0,2 cm e  $l_{em}$  = 0,5 cm. Os valores de fluorescência foram obtidos pela integração da área da banda de fluorescência na faixa de 320-380 nm. As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Varian, no Instituto de Física/USP.

Para as medidas de fluorescência do Trp das amostras contendo lisozima, 5  $\mu$ L das AuNPs 33,8 mg L<sup>-1</sup> foram adicionadas em 90  $\mu$ L da dispersão de lisozima globular ou fibrilar. O Trp foi excitado em 295 nm, o espectro de emissão foi obtido na faixa entre 300 a 450 nm, com abertura das fendas de emissão e excitação de 5 nm, utilizando uma placa de leitura de 96 poços com paredes escuras (Greiner Bio-One #655090). Os valores de fluorescência foram obtidos pela integração da área do sinal de fluorescência na faixa de 320-380 nm. A intensidade de fluorescência dos espectros não foi ajustada pela correção do filtro interno pois não houve mudança significativa da absorbância com a adição das AuNPs, conforme acompanhado no espectro no UV-Vis no mesmo  $\lambda$  de excitação. As medidas foram realizadas em um leitor de placas Tecan infinite M1000, no MPIP.

Para as medidas de fluorescência da Tioflavina T (ThT) das amostras contendo lisozima, 10  $\mu$ L de cada amostra foi adicionada em 90  $\mu$ L de ThT 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>. O ThT foi excitado em 440 nm, o espectro de emissão foi obtido na faixa entre 450 a 600 nm, com abertura das fendas de emissão e excitação de 5 nm, utilizando uma placa de leitura de 96 poços com paredes escuras (Greiner Bio-One #655090). Todas as medidas foram feitas em triplicatas e as intensidades de fluorescência foram corrigidas pelo branco tampão PBS. As medidas foram realizadas em um leitor de placas Tecan infinite M1000, no MPIP.

### 3.3.9. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram obtidas na região de 195 a 260 nm para as amostras contendo CALB e 200 a 260 nm para as amostras contendo lisozima, com velocidade de 50 nm/min, abertura da fenda de 1 nm, com intervalo de 0,5 nm, à 25°C, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mm. Todas as medidas foram feitas pela média de 10 acumulações e os espectros foram corrigidos pelo espectro

branco água (amostras contendo CALB) ou tampão PBS (amostras contendo lisozima). Os espectros foram apresentados utilizando a elipticidade molar residual (MRE) em graus  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ , o qual é definido pela equação 3 a seguir <sup>148</sup>:

$$MRE = \frac{MRW \theta}{10dC} \quad (\text{equação 3})$$

onde,  $\theta_{obs}$  é a elipticidade em miligraus,  $d$  é o caminho óptico da célula em centímetros,  $C$  é a concentração da proteína em  $\text{g mL}^{-1}$ .  $MRW$  é a massa residual média e é definida por  $MRW = M/(N-1)$ , onde  $M$  é a massa molar em Dalton e  $N$  é o número de aminoácidos presentes na proteína. Para a CALB, o valor de  $M$  é  $33000 \text{ g mol}^{-1}$  e  $N$  é 317 <sup>98</sup>. Para a lisozima, o valor de  $M$  é  $14300 \text{ g mol}^{-1}$  e  $N$  é 129 <sup>167</sup>. As medidas de DC foram feitas utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815, no Departamento de Bioquímica/UFPR (amostras contendo CALB) e no MPIP (amostras contendo lisozima).

### 3.3.10. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

As medidas de ITC foram realizadas pela titulação de 25 alíquotas de  $2 \mu\text{L}$  cada por uma seringa de injeção automática contendo  $50 \mu\text{L}$  das dispersões de lisozima globular ou fibrilar  $1,1 \text{ mg mL}^{-1}$  à célula calorimétrica com  $300 \mu\text{L}$  de AuNPs  $0,0114 \text{ g L}^{-1}$ . As injeções foram feitas com 250 segundos de intervalo e agitação de 350 rpm, a  $25^\circ\text{C}$ . O calor resultante após cada injeção foi subtraído do calor de diluição da titulação da lisozima em água. As medidas foram feitas em um Nano ITC TA instruments, no MPIP.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE NANOBASTÕES DE OURO E POLISSACARÍDEOS<sup>1</sup>

#### 4.1.1. Motivação do trabalho

Nanobastões de ouro (AuNRs) são de grande interesse para o desenvolvimento de estruturas auto-organizadas com propriedades específicas para diversas aplicações<sup>59, 168-170</sup>. Usualmente, os AuNRs são obtidos pela síntese mediada pelo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)<sup>160, 171-173</sup>, formando uma dupla camada do CTAB na superfície dos AuNRs. Apesar do CTAB ser o responsável por manter a estabilização coloidal dos AuNRs em dispersões aquosas por meio de interações eletrostáticas, esta molécula é citotóxica para meios biológicos e também é responsável pela instabilidade dos AuNRs em soluções tampão salino, limitando as aplicações biológicas destes materiais<sup>172-174</sup>. Com isso, a fim de diminuir a citotoxicidade e manter a estabilidade dos AuNRs, os polissacarídeos naturais goma arábica (GA) e quitosana sulfatada (ChiS) foram utilizadas para encapsular os CTAB/AuNRs. A não-toxicidade e a biocompatibilidade da GA e ChiS, além da presença de uma variedade de grupos funcionais em suas estruturas que levam às interações eficientes com os CTAB/AuNRs, são características bastante atrativas para agentes de recobrimento<sup>69, 71, 84, 175</sup>. Portanto, este trabalho contribui para o entendimento das forças que direcionam e controlam as interações superficiais entre esses materiais, fornecendo informações fundamentais para o desenvolvimento de novas nanoestruturas auto-montadas de ouro.

#### 4.1.2. Objetivos específicos

- Recobrir os CTAB/AuNRs com GA e ChiS;
- Avaliar as diferentes estruturas organizadas formadas para as GA@AuNRs e ChiS@AuNRs por imagens de MET e MEV;
- Elucidar a natureza das interações envolvidas entre GA e ChiS com os CTAB/AuNRs por FTIR;

---

<sup>1</sup> 40. DE BARROS, H. R., PIOVAN, L., SASSAKI, G. L., SABRY, D. D., MATTOSO, N., NUNES, A. M., MENEGHETTI, M. R. and RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 152, 479-486, 2016.

- Promover a aplicação de polissacarídeos naturais como agentes estabilizantes para nanomateriais.

#### 4.1.3. Resultados e discussão

Os nanobastões de ouro (AuNRs) sintetizados utilizando o CTAB como agente estabilizante apresentaram tamanho médio de 45 x 15 nm (razão de aspecto em torno de 3). Apesar da presença de partículas esféricas, a maioria das partículas apresentaram o formato de bastões, conforme observado nas imagens de MET na FIGURA 17(A), evidenciando um alto controle da morfologia na síntese.

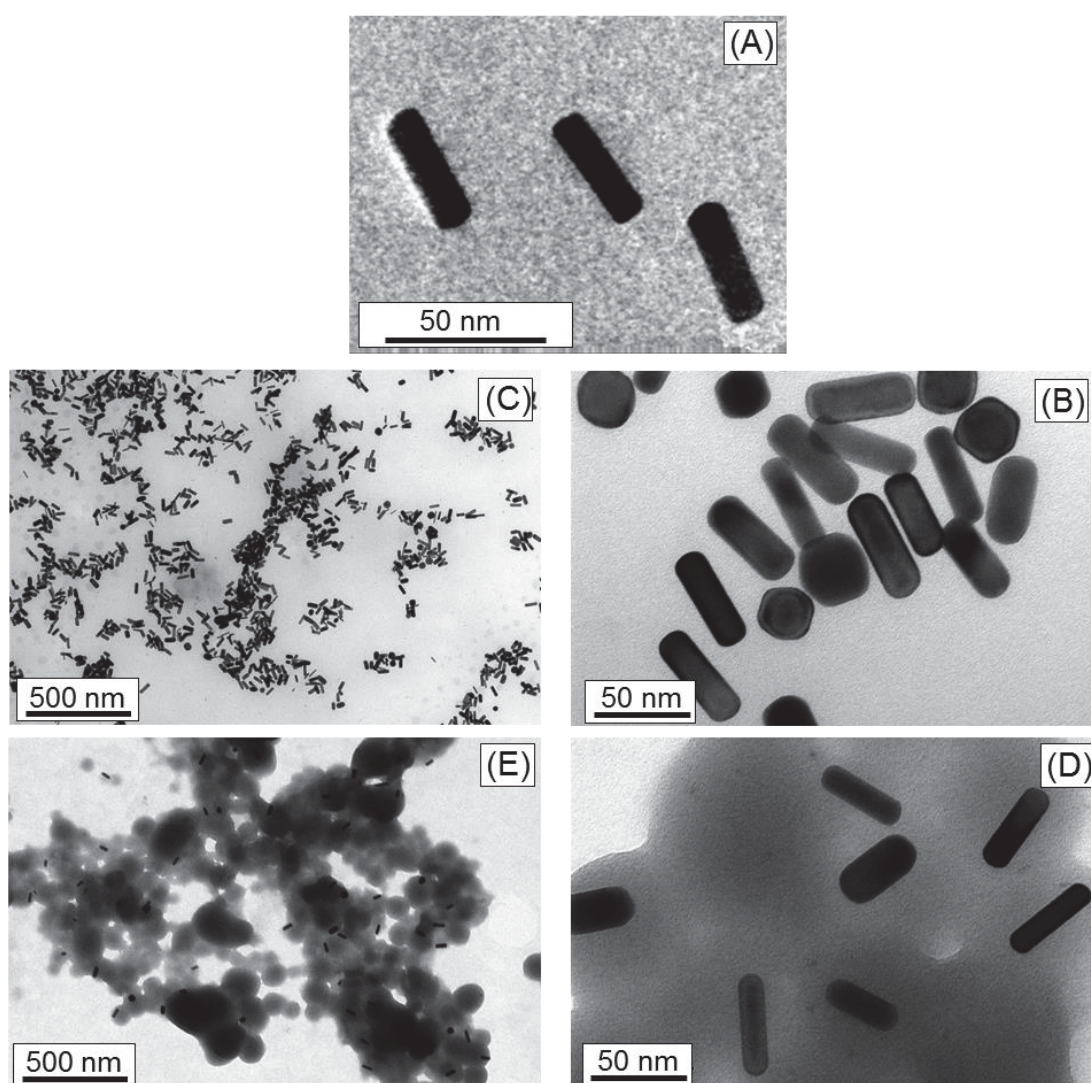


FIGURA 17. Imagens de MET dos (A) AuNRs e após a adsorção com os polissacarídeos (B e C) GA@AuNRs e (D e E) ChiS@AuNRs obtidas em diferentes magnificações. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*.



Os AuNRs foram encapsulados com quitosana sulfatada (ChiS) ou goma arábica (GA) para o estudo de interação entre os polissacarídeos e o CTAB presente na superfície dos AuNRs. A concentração de GA e ChiS foi mantida muito maior do que as dos bastões para garantir o total recobrimento dos AuNRs. Os valores de potencial zeta dos polissacarídeos GA e ChiS foram de -36,3 mV e -28,6 mV, respectivamente. A carga negativa foi atribuída aos grupos funcionais  $\text{COO}^-$  presentes na estrutura da GA e aos grupos  $\text{SO}_4^-$  para a ChiS. Ao final da síntese dos AuNRs em pH  $\sim 5$ , os grupos  $\text{COO}^-$  e  $\text{SO}_4^-$  estão majoritariamente dissociados enquanto que os grupos aminos protonados e neutros presentes na estrutura da GA e ChiS estão praticamente na mesma proporção ( $\text{pK}_a \sim 6$ ). Portanto, com a carga positiva do CTAB atribuída ao grupo amônio quaternário catiônico presente em sua estrutura, os AuNRs apresentam carga superficial líquida positiva <sup>173</sup>, promovendo a interação eletrostática favorável entre a superfície dos AuNRs com a GA e a ChiS.

O tamanho e morfologia dos AuNRs encapsulados por GA (GA@AuNRs) e por ChiS (ChiS@AuNRs) foram mantidos, apresentando tamanhos médios de 47 nm x 15 nm e 43 nm x 14 nm, respectivamente. As imagens de MET na FIGURA 17(B e C) representam as GA@AuNRs e na FIGURA 17(D e E) as ChiS@AuNRs em diferentes ampliações. É evidente pelas imagens de MET que as GA@AuNRs formam uma estrutura de partículas aglomeradas do tipo *clusters* e a presença da GA não foi identificada nas imagens. Por outro lado, nas ChiS@AuNRs as partículas estão separadas por uma estrutura densa, a qual sugere-se ser a estrutura da ChiS. Imagens adicionais de MET das amostras estão apresentadas no APÊNDICE 1.

A absorção das bandas SPR no espectro UV-Vis apresentadas na FIGURA 18 corrobora com o comportamento observado nas imagens de MET. Os AuNRs apresentam bandas SPR características em  $\lambda_1 = 515$  nm e  $\lambda_2 = 740$  nm e as GA@AuNRs e ChiS@AuNRs apresentam deslocamentos discretos em  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ . Estes deslocamentos pequenos confirmam a adsorção dos polissacarídeos na superfície dos AuNRs devido as alterações da distribuição de cargas superficiais nos AuNRs e da constante dielétrica do meio. Para a ChiS@AuNRs, houve uma forte absorção das bandas SPR promovida provavelmente pela estrutura densa da ChiS ao redor dos AuNRs, da mesma forma como foi observado nas imagens de MET (FIGURA 17(C)).

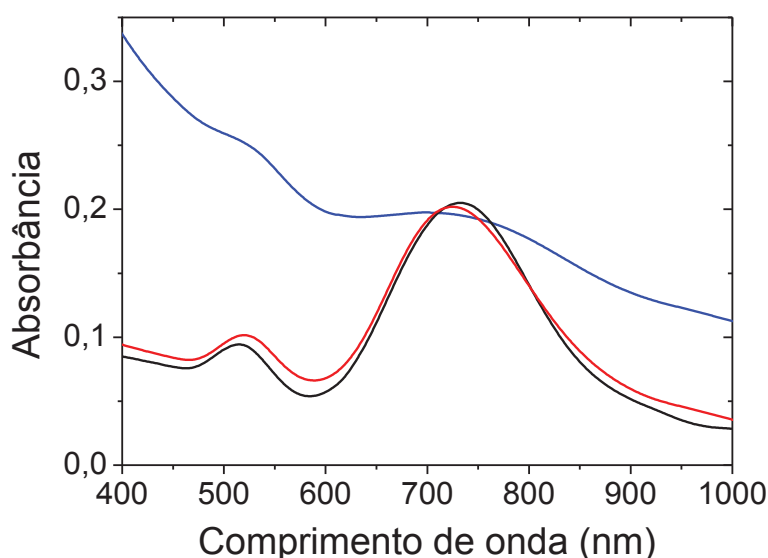


FIGURA 18. Absorção das bandas SPR no espectro UV-Vis dos AuNRs (espectro preto), GA@AuNRs (espectro vermelho) e ChiS@AuNRs (espectro azul) após a lavagem. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*.

Portanto, é evidente que as interações e o arranjo ao redor dos AuNRs ocorreram de maneiras distintas para a GA e a ChiS, originando diferentes estruturas auto-montadas. Para um melhor entendimento da organização dos polissacarídeos ao redor dos AuNRs, imagens de MEV-HR foram obtidas utilizando a detecção por elétrons secundários e elétrons retroespalhados (FIGURA 19). As imagens obtidas pela detecção dos elétrons secundários fornecem informações pelo contraste topográfico e as obtidas por elétrons retroespalhados pela diferença de densidade eletrônica. A análise comparativa das imagens obtidas pelos diferentes detectores no MEV-HR fornece um entendimento mais aprofundado das interações envolvidas e sobre os arranjos das estruturas formados entre os AuNRs e a GA e ChiS.

Da mesma maneira como foi observado nas imagens de MET e pelas bandas SPR, as imagens de MEV-HR mostraram que os AuNRs e as GA@AuNRs são bastante similares, diferenciando-se pela formação de aglomerados de partículas nas GA@AuNRs. Por outro lado, para as ChiS@AuNRs, foi observado que as partículas estão rearranjadas dentro da estrutura da ChiS. As imagens obtidas por elétrons secundários (FIGURA 19 (A), (C) e (E)) mostraram claramente essas diferenças pelo contraste topográfico, obtendo imagens com perspectiva de volume, evidenciando a estrutura tipo-nuvem que a ChiS forma ao redor dos AuNRs



e com as partículas individuais distribuídas por toda a estrutura (FIGURA 19(E)). No entanto, para as GA@AuNRs, a estrutura da GA não é diferenciada nas imagens e os AuNRs estão distribuídos muito próximos uns dos outros, confirmando a formação de aglomerados de partículas (FIGURA 19(C)).

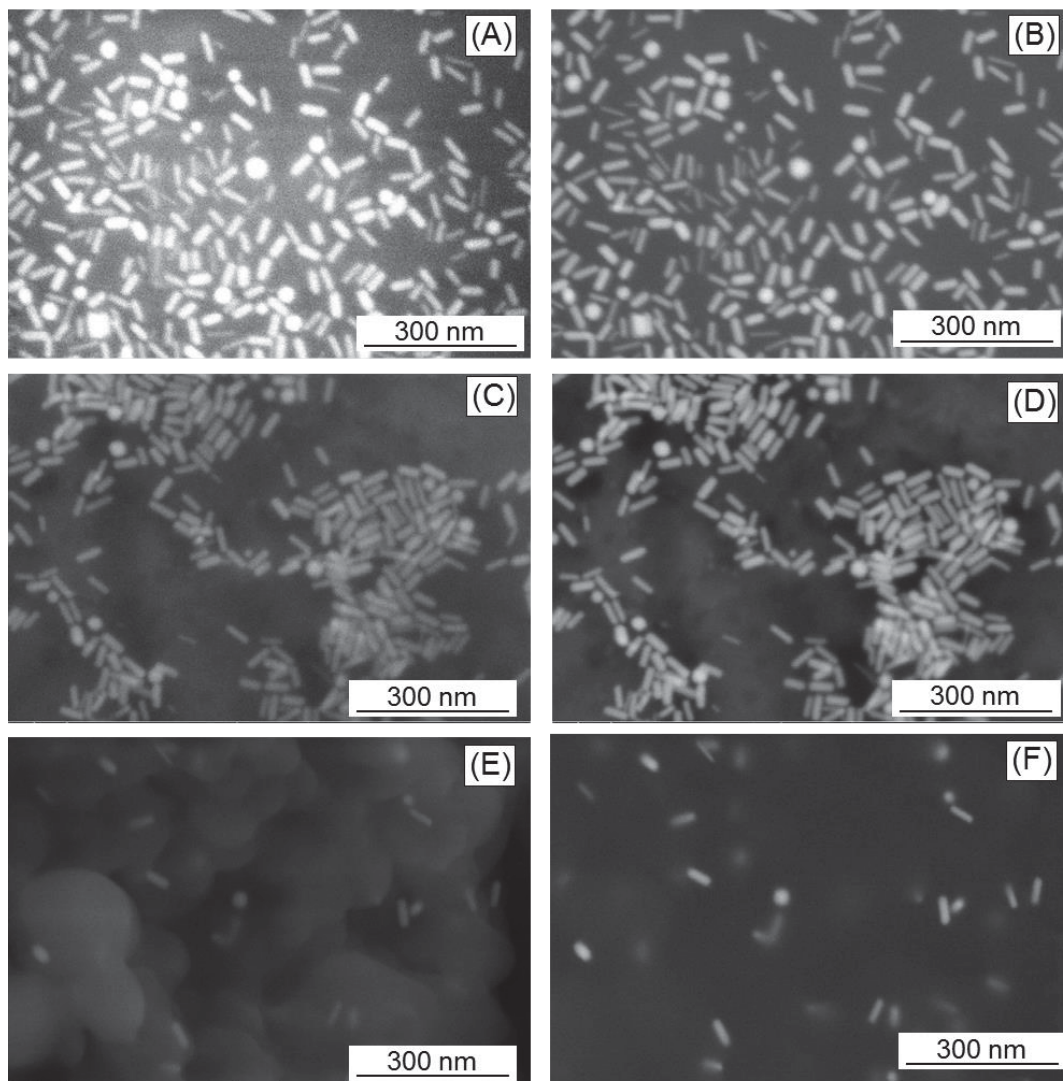


FIGURA 19. Imagens de MEV-HR dos (A e B) AuNRs, (C e D) GA@AuNRs e (E e F) ChiS@AuNRs. As imagens (A), (C) e (E) correspondem às imagens obtidas por elétrons secundários e as imagens (B), (D) e (F) correspondem às imagens obtidas por elétrons retroespalhados. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*

As imagens obtidas por elétrons retroespalhados (FIGURA 19 (B), (D) e (F)) mostram as diferenças promovidas pela densidade eletrônica dos componentes da amostra. Para as GA@AuNRs, não foram observadas diferenças significativas em comparação com as imagens obtidas por elétrons secundários devido à baixa densidade eletrônica da GA em comparação ao ouro e pela fina camada de GA que

se formou no suporte (FIGURA 19(D)). Por outro lado, as imagens obtidas por elétrons retroespalhados para as ChiS@AuNRs são bem diferentes daquelas obtidas por elétrons secundários (FIGURA 19(E)). A densidade eletrônica e o contraste com a matriz orgânica da ChiS evidenciam fortemente que as partículas estão envoltas pela estrutura da ChiS e confirmam que a ChiS atua como um agente eficiente para envolver os AuNRs. Imagens adicionais de MEV-HR das amostras estão apresentadas no APÊNDICE 2.

Portanto, as diferenças observadas para as GA@AuNRs e ChiS@AuNRs podem ser atribuídas às densidades eletrônicas diferentes dos polissacarídeos. A ChiS apresenta maior densidade eletrônica em comparação com a GA devido aos grupos sulfatos presentes em sua estrutura enquanto que a GA é composta principalmente por átomos de menor densidade eletrônica, como C, O e H.

Outro fator que pode ser atribuído aos diferentes arranjos da GA e ChiS ao redor dos AuNRs, é em relação a estrutura de cada polissacarídeo. A ChiS é um polissacarídeo de cadeia linear e apresenta massa molar menor <sup>84</sup>, o que resultou em um arranjo compacto e denso ao redor dos AuNRs e favoreceu a formação de uma estrutura tridimensional. No entanto, a GA é um polissacarídeo altamente ramificado e com massa molar elevada <sup>71, 72</sup>, o que favoreceu a formação de uma estrutura fina ao redor dos AuNRs. Além disso, como é bem conhecido que a GA atua como surfactante e tem solubilidade alta em água <sup>72</sup>, as moléculas de GA que estavam fracamente ligadas à superfície dos AuNRs podem ter sido removidas durante os processos de lavagem. Com isso, a concentração final de GA na superfície dos AuNRs foi diminuída expressivamente e, consequentemente, resultou na formação dos aglomerados de partículas observados nas imagens de microscopia. Em comparação, a ChiS apresenta propriedades de aglutinação e sua solubilidade em água (pH ~5,5) é menor do que a GA <sup>176</sup>, visto que a sulfatação da quitosana foi realizada a fim de melhorar a sua solubilidade em água (pH ~5,5) por ser antes totalmente solúvel apenas em meio ácido (pH ~3,0). Portanto, como a GA é mais solúvel do que a ChiS, resultou em uma maior concentração de moléculas de ChiS do que de GA ao redor dos AuNRs levando à formação de diferentes estruturas. Dessa forma, pela escolha do agente estabilizante é possível controlar a distribuição ou a auto-agregação dos AuNRs a fim de obter propriedades e aplicações distintas. Como por exemplo, *clusters* de AuNPs foram aplicadas em

terapia fototermal <sup>177</sup> e AuNPs individuais e funcionalizadas apresentaram funções biológicas por rotas de sinalização específica <sup>178, 179</sup>.

Dessa forma, a fim de avaliar a natureza das interações entre os polissacarídeos e os AuNRs que levaram às estruturas observadas, as análises de espectroscopia no FTIR foram realizadas. O deslocamento, aparecimento ou ausência de bandas no espectro FTIR fornece informações para elucidar as interações que ocorreram nas estruturas formadas. Primeiro, foi feita a análise dos espectros dos AuNRs e do CTAB apresentados na FIGURA 20. A atribuição das principais bandas está apresentada na TABELA 2.

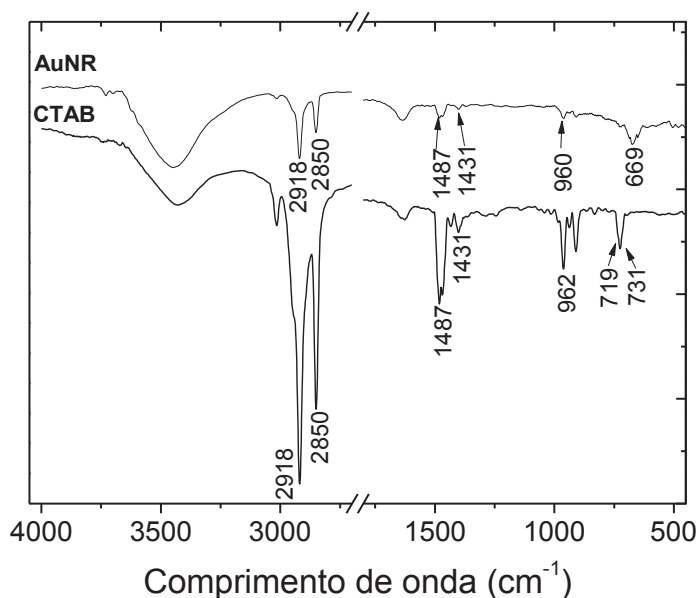


FIGURA 20. Espectro de FTIR dos AuNRs e CTAB com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*

TABELA 2 – Atribuições das principais bandas dos espectros no FTIR do CTAB e AuNRs. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*.

Atribuição <sup>a</sup>	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )	
	CTAB	AuNR
Estiramento simétrico e assimétrico dos -CH <sub>2</sub> - da cadeia do CTAB	2918 e 2850	2918 e 2850
Dobramento angular simétrico e assimétrico dos C-H presentes no grupo H <sub>3</sub> C-N <sup>+</sup>	1487, 1473, 1462 e 1431	1487, 1473, 1462 e 1431
Estiramento do C-N <sup>+</sup>	962	960
Torção dos -CH <sub>2</sub> - presentes na cadeia ((CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> , n>4)	719 e 731	669

<sup>a</sup> Baseado em <sup>180-184</sup>.

As principais bandas presentes no espectro de CTAB foram preservadas no espectro dos AuNRs. As bandas em 2918 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  referentes às vibrações de estiramento simétrica e assimétrica dos  $-\text{CH}_2-$  presentes na cadeia alquílica do CTAB não foram alteradas. Esse comportamento sugere que a cadeia alquílica e hidrofóbica do CTAB não interagiu com a superfície dos AuNRs. Dessa forma, como o meio de dispersão é aquoso, as cadeias hidrofóbicas do CTAB interagem entre si, formando uma dupla camada na superfície dos AuNRs, não restringindo os modos vibracionais de estiramento <sup>160</sup>. Além disso, as bandas em 1487, 1473, 1462 e 1431  $\text{cm}^{-1}$  são referentes às vibrações de dobramento angular (ou vibrações *scissoring*) simétricas e assimétricas dos C-H presentes na fração  $\text{CH}_3-\text{N}^+$  e a banda em 960  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a vibração de estiramento C- $\text{N}^+$  apresenta intensidade diminuída e pouco deslocada no espectro dos AuNRs em comparação ao espectro de CTAB puro. Essa redução na intensidade pode ser atribuída aos grupos da porção hidrofílica do CTAB que estão interagindo com os AuNRs. A FIGURA 21 apresenta um esquema ilustrativo da organização do CTAB na superfície dos AuNRs.

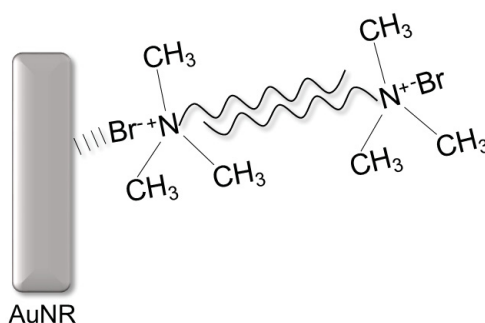


FIGURA 21. Esquema ilustrativo da interação entre os AuNRs e o CTAB. As cadeias alquílicas hidrofóbicas do CTAB interagem entre si formando uma dupla camada na superfície dos AuNRs. Fonte: adaptado de <sup>40, 160</sup>.

Além disso, as bandas presentes na região de menores comprimentos de onda no espectro FTIR também fornecem informações a respeito da interação entre o CTAB e a superfície dos AuNRs. As bandas correspondentes a vibração de torção (ou vibrações *rocking*) dos grupos  $-\text{CH}_2$  estão localizadas em 719 e 731  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do CTAB puro enquanto que no espectro dos AuNRs é observada apenas uma banda em 669  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, estas alterações indicam as restrições de movimento que as cadeias alquílicas do CTAB sofreram, confirmando a formação da dupla camada do CTAB ao redor dos AuNRs.

Do mesmo modo, a análise do espectro no FTIR obtido para as GA@AuNRs forneceu informações importantes para a elucidação das interações envolvidas. O espectro das GA@AuNRs apresentou mudanças significativas em comparação aos espectros dos AuNRs e GA, conforme observado na FIGURA 22. A atribuição das principais bandas está apresentada na TABELA 3. As bandas características dos AuNRs promovidas pelas vibrações de estiramento simétricas e assimétricas dos grupos  $-CH_2-$  presentes na cadeia alquílica do CTAB ( $2918$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) foram mantidas no espectro dos GA-AuNRs. Dessa forma, revela que o CTAB ainda está presente na superfície dos AuNRs, sugerindo que a interação com a GA ocorreu via o CTAB remanescente. Além disso, o desaparecimento das bandas em  $1473$ ,  $1462$ ,  $1433$  e  $960\text{ cm}^{-1}$  referentes a fração positiva  $C-N^+$  do CTAB sugere que ocorreu a interação com os grupos negativos presentes na estrutura da GA. Essa evidência foi confirmada pelo desaparecimento das duas bandas em  $1608$  e  $1419\text{ cm}^{-1}$  no espectro das GA@AuNRs atribuídas as vibrações de estiramento simétrica e assimétrica dos grupos  $-COO^-$  presentes na estrutura da GA. Além disso, a mudança do perfil das bandas referentes ao estiramento dos grupos C-O ( $1253$ ,  $1143$ ,  $1064$  e  $1031\text{ cm}^{-1}$ ) devido as interações com o CTAB na superfície dos AuNRs também confirmam as interações eletrostáticas envolvidas. Ainda, as novas bandas que surgiram próximas de  $1060\text{ cm}^{-1}$  e na região entre  $700$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  podem ser associadas com as interações promovidas pela adsorção da GA na superfície dos AuNRs.

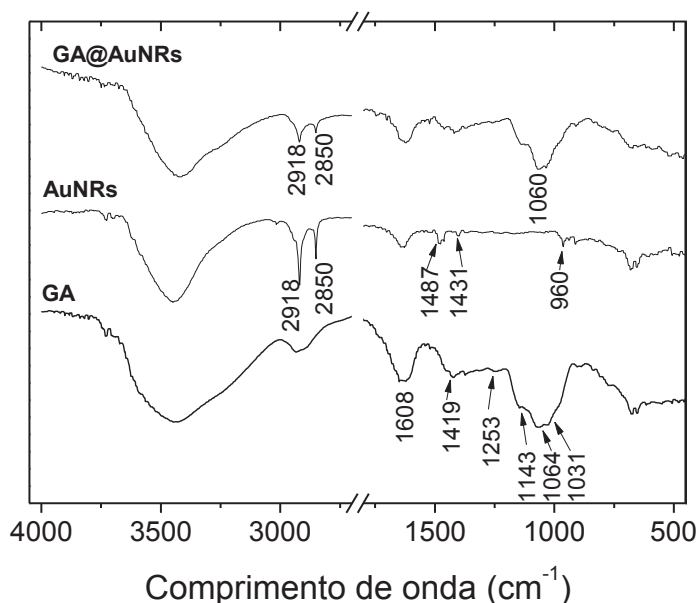


FIGURA 22. Espectro de FTIR das GA@AuNRs, AuNRs e GA com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*.

TABELA 3 - Atribuições das principais bandas dos espectros no FTIR dos AuNRs, GA, GA@AuNRs, ChiS e ChiS@AuNRs. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da *Elsevier*.

Atribuições <sup>a</sup>	Comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> )				
	AuNR	GA	GA@AuNR	ChiS	ChiS@AuNR
Estiramento simétrico e assimétrico dos -CH <sub>2</sub> - da cadeia do CTAB	2918 e 2850	-	2918 e 2850	-	2918 e 2850
Estiramento simétrico e assimétrico dos sais de ácido carboxílico -COO <sup>-</sup>	-	1608 e 1419	-	-	-
Dobramento angular simétrico e assimétrico dos C-H presentes no grupo H <sub>3</sub> C-N <sup>+</sup>	1487, 1473, 1462 e 1431	-	1487	-	-
Estiramento C-O	-	1253, 1143, 1064 e 1031	-	1062 e 1004	1062 e 1004
Pode ser atribuído as interações que ocorrem nas GA@AuNRs	-	-	1060, 700-400	-	-
Estiramento C-N <sup>+</sup>	962	-	-	-	-
Banda amida C=O	-	-	-	1647	1647
Banda associada ao -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-	-	-	1541	1542
Estiramento simétrico dos C-O-C	-	-	-	1153	1153

<sup>a</sup> Baseado em <sup>86, 182, 185</sup>.

Portanto, a partir da interpretação dos espectros FTIR e das informações obtidas, foi sugerido os GA@AuNRs estão organizados de forma que a GA está recobrando os AuNRs, via interações eletrostáticas com o CTAB, conforme representado esquematicamente na FIGURA 23. Dessa forma, visando o potencial uso dos AuNRs para diversas aplicações biológicas, os GA@AuNRs são promissores para estudos com a finalidade de diminuir a toxicidade dos AuNRs e conservar suas propriedades.



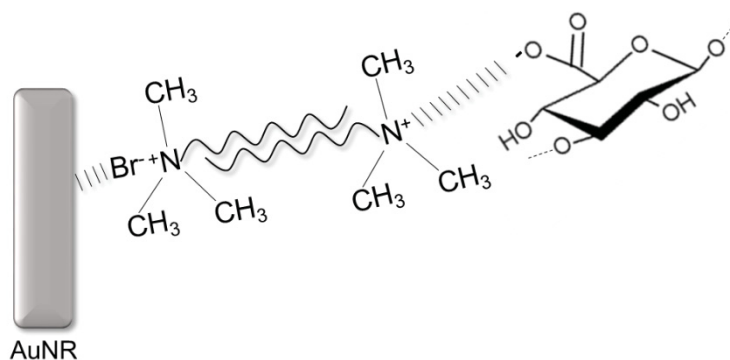


FIGURA 23. Esquema ilustrativo da organização dos GA@AuNRs promovida pelas interações eletrostáticas entre os grupos carregados positivamente do CTAB presente na superfície dos AuNRs e os grupos carregados negativamente na estrutura da GA.

Um comportamento similar foi observado na análise do espectro no FTIR dos ChiS@AuNRs (FIGURA 24). A atribuição das principais bandas está apresentada na TABELA 3. No espectro dos ChiS@AuNRs, as bandas em 2918 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  referentes as vibrações simétricas e assimétricas dos grupos  $-\text{CH}_2-$  permanecem enquanto que as bandas em 1487-1433 e em 960  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao grupo  $\text{C}-\text{N}^+$ , desaparecem em comparação ao espectro dos AuNRs. Além disso, as principais bandas observadas no espectro da ChiS em 1647, 1542, 1153, 1072, 1062 e 1004  $\text{cm}^{-1}$ , referentes aos diversos grupos funcionais presentes na estrutura

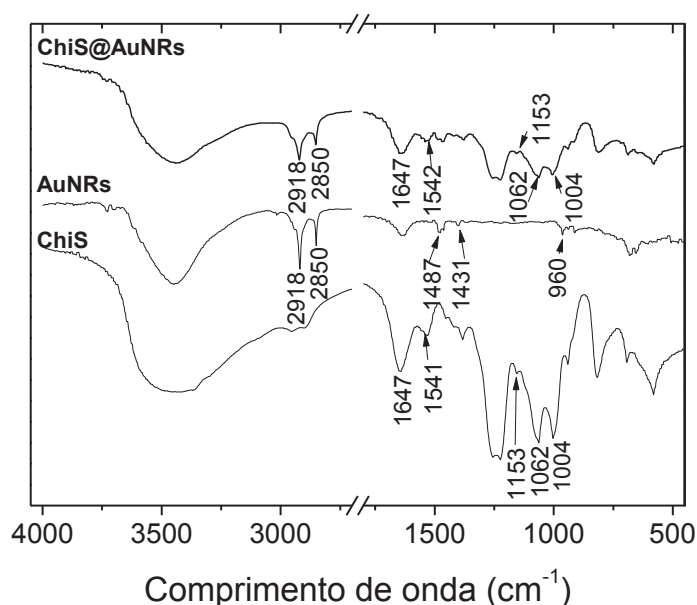


FIGURA 24. Espectro de FTIR das ChiS@AuNRs, AuNRs e ChiS com a atribuição das principais bandas. Reproduzido de <sup>40</sup> com permissão da Elsevier.

da ChiS, permanecem no espectro dos ChiS@AuNRs; porém, com intensidade reduzida. Portanto, sugere que a interação entre os grupos C-N<sup>+</sup> do CTAB e a ChiS ocorrem pela interação eletrostática via interações mútuas de diversos grupos funcionais carregados negativamente presentes na ChiS. Logo, as interações envolvidas na organização da ChiS recobrindo os AuNRs, via interação com o CTAB, é bastante similar aos GA@AuNRs, conforme esquematizado na FIGURA 25.

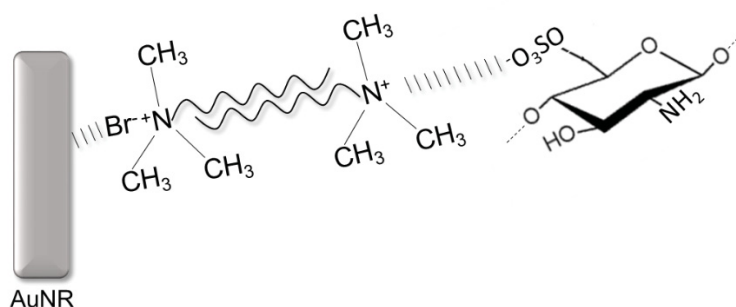


FIGURA 25. Esquema ilustrativo da organização dos ChiS@AuNRs promovida pelas interações eletrostáticas entre os grupos carregados positivamente do CTAB presente na superfície dos AuNRs e os grupos carregados negativamente na estrutura da ChiS.

Para as interações envolvidas nos ChiS@AuNRs, é importante ressaltar que o enxofre presente nos grupos sulfatos na estrutura da ChiS não apresenta as mesmas características de interação com AuNPs como ocorre para o enxofre presentes em grupos tióis. É bem conhecido que os grupos tióis apresentam ligação preferencial com a superfície das AuNPs, promovidas por ligações covalentes termodinamicamente favoráveis <sup>186-189</sup>. Por outro lado, o enxofre presente nos grupos sulfatos da ChiS é menos reativo nesse tipo de interação já que não apresenta pares de elétrons livres, impedindo a presença de novos sítios de ligação com a superfície das AuNPs. No entanto, os grupos sulfatos estabilizam AuNPs por interações eletrostáticas promovidas pelos grupos hidroxilas, carboxilas e amino.

#### 4.1.4. Conclusões parciais

Utilizando uma metodologia simples, foi demonstrado que a GA e a ChiS interagiram com os AuNRs, formando estruturas auto-organizadas distintas, as quais dependeram da estrutura e das propriedades de cada polissacarídeo. Por



imagens de microscopias, foi caracterizado que a GA produziu agregados tipo *clusters* de AuNRs. Por outro lado, a ChiS atuou como um eficiente agente encapsulante, resultando em AuNRs individuais, as quais foram separadas pelas moléculas de ChiS. Dessa forma, pela escolha do polissacarídeo aplicado, foi possível manipular a formação de AuNRs individuais ou *clusters*. Por análises de espectroscopia no FTIR, foi demonstrado que o CTAB não foi totalmente removido da superfície dos AuNRs. A GA e a ChiS interagiram com os AuNRs via os grupos positivos  $-C-N^+$  do CTAB e os grupos carregados negativamente dos polissacarídeos, por interações eletrostáticas, sem alterar os grupos  $-CH_2-$  do CTAB, encapsulando os AuNRs. Portanto, associando com trabalhos na literatura, é esperado que GA@AuNRs e ChiS@AuNRs apresentem menor toxicidade do que os AuNRs com CTAB exposto em sua superfície.

## 4.2. ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA IMOBILIZAÇÃO DA CALB EM NANOPARTÍCULAS DE OURO

### 4.2.1. Motivação do trabalho

É bem conhecido que as nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam superfície favorável para a adsorção de biomoléculas, como por exemplo, quando expostas à meios biológicos<sup>19, 49, 190</sup>. Baseado nisso e buscando novas metodologias mais ecológicas e o uso seguro das AuNPs, as biomoléculas vêm sendo empregadas como agentes estabilizantes ou de revestimento na síntese de AuNPs<sup>19, 115, 191</sup>. Dessa forma, são obtidos materiais estáveis, biocompatíveis e, ao mesmo tempo, inserindo bio-funcionalidades na superfície das AuNPs<sup>19</sup>. No entanto, apesar do crescente aumento nas pesquisas nessa área, apenas poucos trabalhos foram encontrados utilizando enzimas como as biomoléculas alvo<sup>115, 135, 136, 192</sup>. Com isso, neste trabalho foram exploradas o uso da lipase de *Candida* sp. (CALB) como agente estabilizante para a síntese das AuNPs e um estudo comparativo da adsorção da CALB em AuNPs previamente sintetizadas. Foram analisadas a estabilidade das AuNPs promovidas pela CALB assim como as mudanças na conformação e nas propriedades catalíticas da CALB. Apesar da variedade de trabalhos analisando as mudanças de conformação de enzimas pela interação com as AuNPs<sup>24, 135, 192</sup>, não foram encontrados estudos com esse

mesmo objetivo utilizando lipases; embora materiais bio-híbridos lipases-AuNPs venham sendo explorados para aplicações em biocatálise, biossensores, imobilização de enzimas e resolução cinética<sup>94, 193-196</sup>. Portanto, além de contribuir para o desenvolvimento do uso de enzimas como agentes estabilizantes para AuNPs, este trabalho fornece informações indispensáveis para o uso seguro desses materiais para serem utilizados em diversas aplicações.

#### 4.2.2. Objetivos específicos

- Utilizar a CALB como agente estabilizante na síntese de AuNPs ( $_{SA}CALBAuNPs$ );
- Avaliar a adsorção da CALB na superfície das AuNPs ( $CALB@AuNPs$ );
- Comparar as interações envolvidas entre as  $_{SA}CALBAuNPs$  e  $CALB@AuNPs$  assim como os efeitos causados na conformação da CALB;
- Caracterizar as propriedades destes materiais por imagens de MET, potencial zeta, eletroforese em gel, espectroscopias no UV-Vísivel, de fluorescência e de CD;
- Analisar a atividade catalítica da CALB,  $_{SA}CALBAuNPs$  e  $CALB@AuNPs$ ;
- Explorar diferentes razões CALB/AuNPs a fim de avaliar a dependência entre a faixa de concentração das AuNPs e os danos causados na estrutura da CALB.

#### 4.2.3. Resultados e discussão

As nanopartículas obtidas na síntese de AuNPs utilizando a CALB como agente estabilizante (SA) foram denominadas de  $_{SA}CALB@AuNPs$ . A CALB atuou como um ótimo SA durante a síntese onde nanopartículas estáveis e homogêneas foram obtidas, mesmo sendo utilizadas dispersões aquosas de CALB em baixa concentração ( $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A estabilidade das AuNPs foi acompanhada pelo monitoramento da banda SPR no UV-Vis durante as semanas seguintes.

É bem conhecido que as proteínas apresentam menor solubilidade próximo ao seu ponto isoelétrico (pI)<sup>197</sup>. A CALB apresenta um pI teórico de 5,8<sup>98</sup>. Como foi utilizado água como solvente (pH ~5,5), agregados visíveis da CALB foram observados em maiores concentrações de proteína. A síntese das  $_{SA}CALB@AuNPs$  utilizando dispersões mais concentradas de CALB (20 e  $42 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) não apresentaram banda SPR das AuNPs evidente no espectro no UV-Vis

(FIGURA 26). Além disso, a síntese das  $_{SA}CALB@AuNPs$  utilizando dispersões de CALB ainda mais diluídas ( $< 0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) não foram eficientes para o controle do tamanho e estabilidade das AuNPs. Portanto, baseado nos resultados prévios de concentração, a dispersão de CALB com concentração  $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi utilizada na síntese das  $_{SA}CALB@AuNPs$  adequadamente.

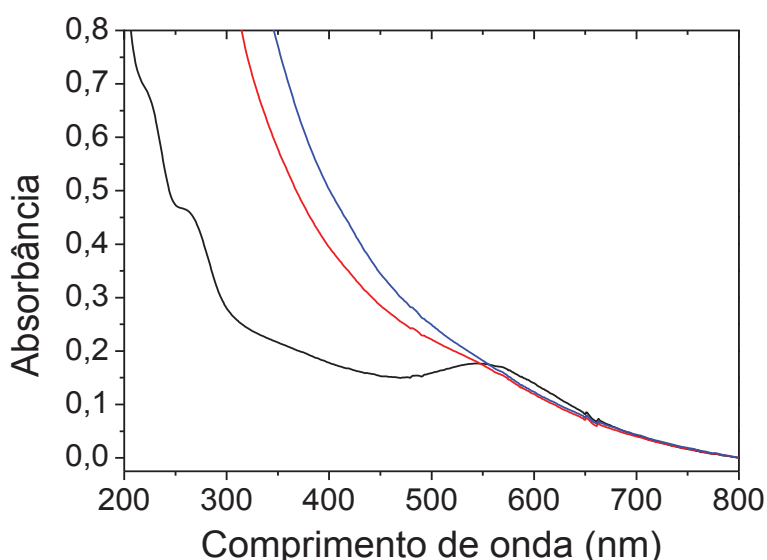


FIGURA 26. Espectro no UV-Vis das  $_{SA}CALB@AuNPs$  sintetizadas com CALB nas concentrações de  $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$  (espectro preto),  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  (espectro vermelho) e  $42 \mu\text{mol L}^{-1}$  (espectro azul).

A imagem de MET apresentada na FIGURA 27(A) mostra que as nanopartículas nas  $_{SA}CALB@AuNPs$  são principalmente esféricas com tamanho médio de  $3,5 \pm 0,7 \text{ nm}$  e que estão envolvidas pela estrutura da CALB. A imagem apresentada no *inset* obtida por MET de alta resolução (MET-HR) evidencia e confirma a camada de CALB ao redor da superfície das AuNPs. A FIGURA 27(B) apresenta uma imagem da CALB para evidenciar a sua estrutura, a qual corresponde a pequenos agregados globulares da enzima.

A fim de elucidar as interações envolvidas entre a CALB e as AuNPs, também foi analisada a adição da CALB em AuNPs previamente sintetizadas para comparação das propriedades. Para isso, foram preparadas AuNPs estabilizadas por citrato de sódio, por ser uma síntese muito bem conhecida para obtenção de AuNPs estáveis com controle de tamanho e morfologia <sup>34, 41, 162</sup>. Além disso, como as propriedades das AuNPs são diretamente dependentes do seu tamanho <sup>36</sup>, AuNPs com aproximadamente o mesmo tamanho das obtidas em  $_{SA}CALB@AuNPs$

foram sintetizadas. Com isso, foi obtido o material bio-híbrido chamado de CALB@AuNP, os quais são estáveis sob as mesmas condições estudadas para as  $_{SA}CALB@AuNPs$ . A FIGURA 27(C) apresenta a imagem de MET das AuNPs estabilizadas com citrato com tamanho médio de  $4,3 \pm 0,7$  nm e a FIGURA 27(D) apresenta as AuNPs após a adição da CALB, obtendo as CALB@AuNPs com a mesma distribuição de tamanho. Conforme observado, a adição da CALB nas AuNPs não levou à agregação das nanopartículas; portanto, indicando que as propriedades das AuNPs foram mantidas. Dessa forma, as CALB@AuNPs se mostraram como uma metodologia apropriada para comparação com as  $_{SA}CALB@AuNPs$  para o estudo físico-químico das interações na interface AuNPs-CALB. Imagens adicionais de MET das amostras estão apresentadas no APÊNDICE 3.

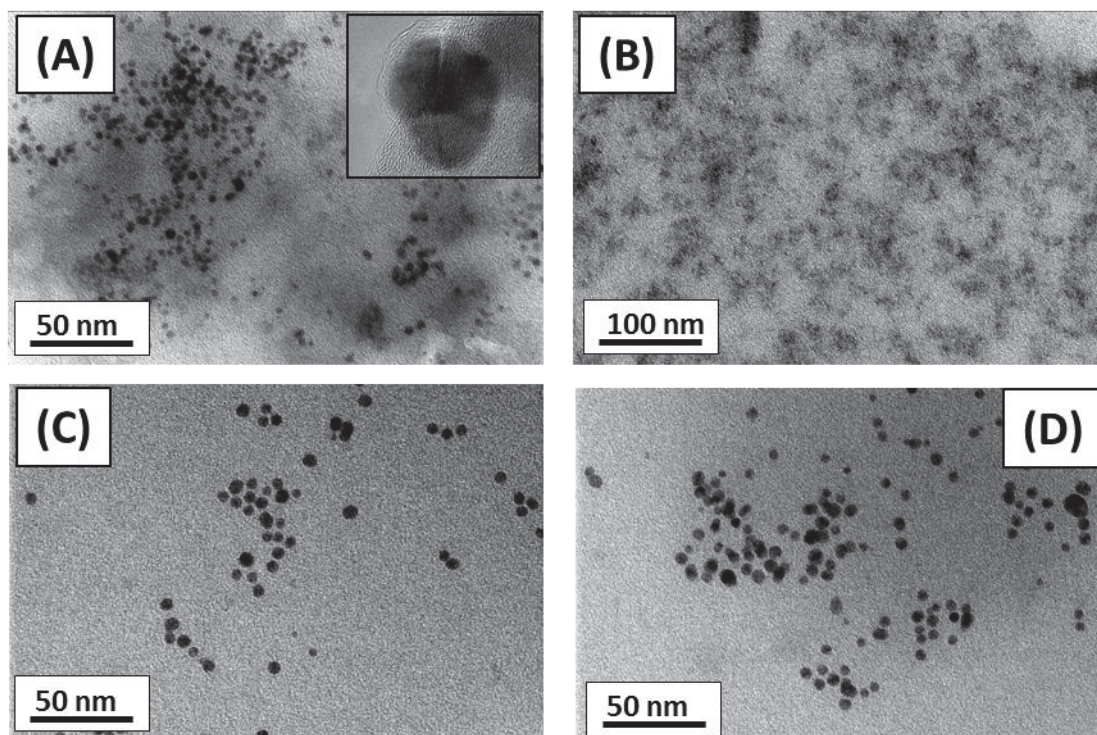


FIGURA 27. Imagens de MET da (A)  $_{SA}CALB@AuNPs$  com *inset* mostrando em detalhe a camada de CALB na superfície da AuNPs adquirida por MET-HR, (B) CALB, (C) AuNPs estabilizadas por citrato e (D) CALB@AuNPs.

O monitoramento da banda SPR no espectro no UV-Vis (FIGURA 28) confirmou as informações obtidas pelas imagens de MET. As AuNPs estabilizadas por citrato apresentaram um  $\lambda_{max}$  em 510 nm. O deslocamento para  $\lambda_{max}$  maiores de 515 nm e 524 nm para CALB@AuNPs e  $_{SA}CALB@AuNPs$ , respectivamente, confirmaram a adsorção da CALB na superfície das AuNPs devido às mudanças

provocadas na distribuição eletrônica na superfície das AuNPs. Além disso, o deslocamento mais acentuado de  $\lambda_{\text{max}}$  e a banda SPR mais larga para as  $_{\text{SA}}\text{CALB@AuNPs}$  sugerem que a adsorção da CALB na superfície das AuNPs ocorreu de uma maneira diferente para as  $\text{CALB@AuNPs}$  e  $_{\text{SA}}\text{CALB@AuNPs}$ .

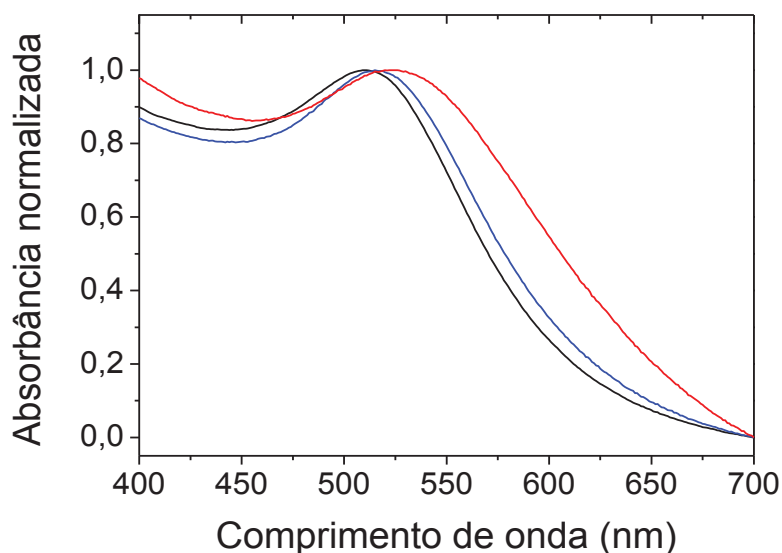


FIGURA 28. Absorção normalizada das bandas SPR no espectro no UV-Vis das AuNPs (espectro preto),  $_{\text{SA}}\text{CALB@AuNPs}$  (espectro vermelho),  $\text{CALB@AuNPs}$  (espectro azul).

Conforme observado pelas imagens de MET e as bandas SPR, as interações envolvidas entre as AuNPs e as CALB não levou à agregação das AuNPs, indicando que as propriedades das AuNPs foram mantidas em ambas  $\text{CALB@AuNPs}$  e  $_{\text{SA}}\text{CALB@AuNPs}$ . É conhecido que a interação entre proteínas e nanopartículas metálicas é atribuída às interações preferenciais dos grupos aminoácidos das proteínas nas facetas nanocristalinas<sup>19</sup>. Essas interações podem levar à alterações na estrutura e nas funções das proteínas<sup>27</sup>. Portanto, para elucidar os comportamentos distintos observados nessas interações, assim como a influência nas propriedades físico-químicas desses materiais, também foi analisado o efeito que as AuNPs podem ter provocado na estrutura e funções da CALB.

Com esse objetivo, a estrutura terciária da CALB foi analisada pela fluorescência do Trp, conforme apresentado na FIGURA 29. A CALB tem 5 resíduos de Trp em sua estrutura<sup>98</sup>. O espectro de fluorescência da CALB exibiu um máximo de fluorescência em 323 nm, típico para resíduos de Trp localizados



no interior da estrutura da enzima <sup>98</sup>. Na presença das AuNPs, a fluorescência do Trp teve um deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  para 349 nm e 351 nm para CALB@AuNPs e <sub>SA</sub>CALB@AuNPs, respectivamente. Estes deslocamentos para  $\lambda_{\text{max}}$  maiores mostram que os resíduos de Trp interagiram com as AuNPs. Dessa forma, a interação da CALB com a superfície das AuNPs (CALB@AuNPs) e durante a síntese das AuNPs (<sub>SA</sub>CALB@AuNPs) levou a mudanças na estrutura terciária da CALB.

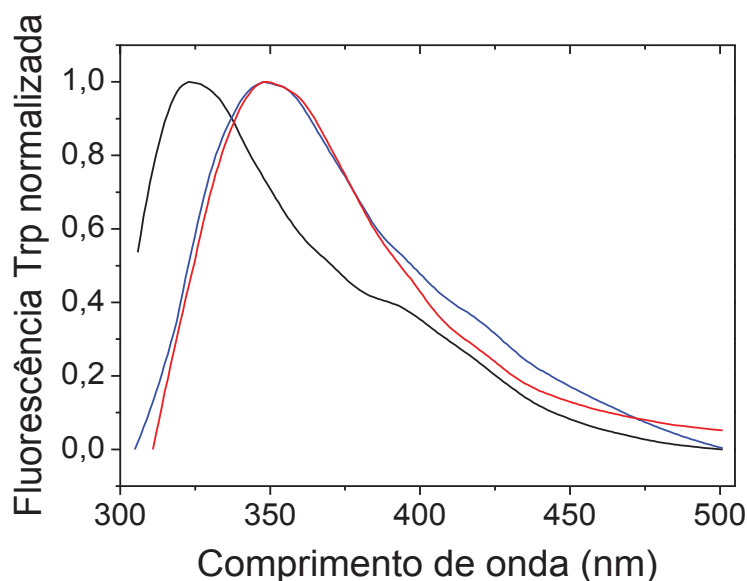


FIGURA 29. Espectro normalizado de emissão de fluorescência do Trp para CALB (espectro preto), <sub>SA</sub>CALB@AuNPs (espectro vermelho) e CALB@AuNPs (espectro azul).

Além disso, esses deslocamentos também podem ser associados à exposição dos resíduos de Trp para o meio aquoso promovido pela interação com as AuNPs. É bem conhecido que esse tipo de mudança na conformação da proteína pode acarretar o desenovelamento da sua estrutura e, conseqüentemente, na diminuição ou mesmo na perda das suas propriedades inerentes <sup>138</sup>. Com isso, para correlacionar com as propriedades da estrutura terciária observadas por fluorescência do Trp, medidas de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizadas para monitorar os possíveis efeitos causados na estrutura secundária da CALB promovidas pelas interações com as AuNPs.

A CALB é uma enzima com conformação  $\alpha$ -hélice, caracterizada pelos dois sinais negativos em 208 nm e 222 nm no espectro de CD (FIGURA 30) <sup>98</sup>. De forma interessante, apesar dos espectros diferentes observados anteriormente na

fluorescência do Trp, o espectro de CD da CALB@AuNP foi bastante similar ao espectro da CALB. O sinal em 222 nm foi mantido para as CALB@AuNPs. As mudanças no sinal 222 nm são normalmente utilizadas para monitorar o processo de desenovelamento de proteínas <sup>148</sup>. Por outro lado, no espectro das <sub>SA</sub>CALB@AuNPs, a intensidade dos sinais em 208 nm e 222 nm foi reduzida. A diminuição no sinal da elipticidade do CD pode ser associado com a agregação da proteína <sup>98</sup>. No entanto, como o espectro manteve o mesmo perfil característico da CALB e nenhum novo sinal foi notado para as <sub>SA</sub>CALB@AuNPs, sugere-se que houve redução da quantidade da conformação  $\alpha$ -hélice sem o aparecimento de outras estruturas irregulares na CALB <sup>98</sup>. Estruturas irregulares são caracterizadas geralmente por um sinal negativo intenso e largo ao redor de 200 nm no espectro de CD <sup>148</sup>. Portanto, associando as informações obtidas pela análise dos espectros de CD e pela fluorescência do Trp, foi sugerido que a CALB presente durante o crescimento das AuNPs atuando como agente estabilizante (<sub>SA</sub>CALB@AuNPs) sofreu alterações mais significativas em sua estrutura do que a CALB adicionada em AuNPs previamente sintetizadas (CALB@AuNPs).

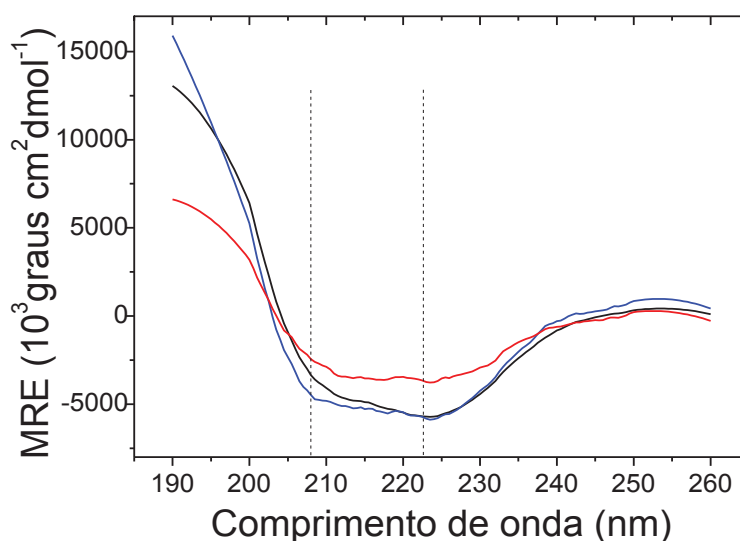


FIGURA 30. Espectro de CD para a CALB (espectro preto), <sub>SA</sub>CALB@AuNPs (espectro vermelho) e CALB@AuNPs (espectro azul), destacando os sinais em 208 nm e 222 nm característicos da estrutura  $\alpha$ -hélice.

As mudanças na conformação da CALB promovidas pela interação com as AuNPs podem afetar as propriedades inerentes da enzima. Como por exemplo,

funções fundamentais como a sua atividade catalítica <sup>27</sup>. Com isso, com o objetivo de avaliar o efeito das AuNPs provocado na conformação da CALB conforme observado pela fluorescência do Trp e CD, uma avaliação da atividade catalítica da CALB em função do tempo foi monitorada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) (FIGURA 31).

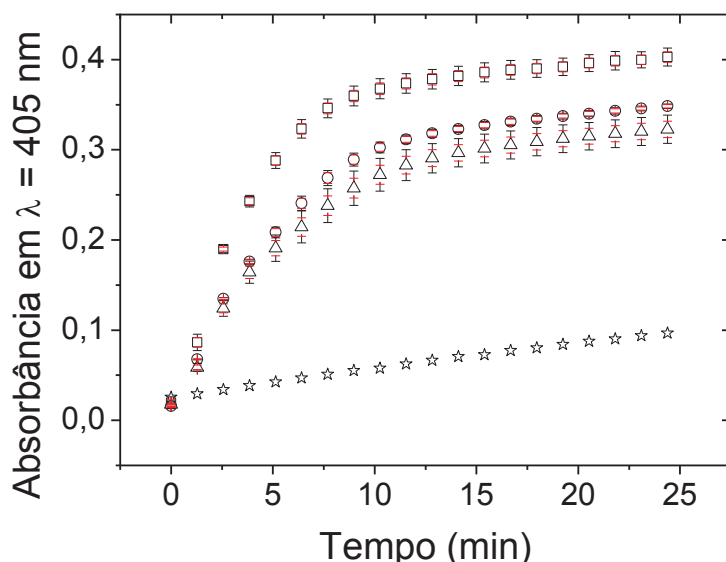


FIGURA 31. Avaliação da atividade catalítica da CALB (quadrados), CALB@AuNPs (círculos) e *sA*CALB@AuNPs (triângulos) na hidrólise do *p*NPP em função do tempo, monitorando a formação do *p*NP pela absorvância em  $\lambda = 405$  nm no espectro no UV-Vis. A curva representada pelas estrelas é referente a reação controle na ausência de qualquer catalisador (auto-hidrólise do *p*NPP). As barras em preto representam o desvio padrão (SD) e as barras em vermelho representam o erro padrão (SE) da média das 3 medidas.

A CALB catalisa rapidamente a hidrólise do *p*NPP, produzindo o *p*-nitrofenolato (*p*NP), o qual é caracterizado pela coloração amarela e quantificado pela absorvância em  $\lambda = 405$  nm no espectro no UV-Vis (curva representada por círculos fechados). A quantidade de *p*NP produzida na ausência de qualquer catalisador (auto-hidrólise do *p*NPP) foi reduzida expressivamente no mesmo período (curva representada por estrelas). Como esperado baseado nas informações obtidas por fluorescência do Trp e CD, as CALB@AuNPs e *sA*CALB@AuNPs exibiram atividade catalítica reduzida em comparação com a CALB (curvas representadas por círculos abertos e triângulos, respectivamente). Além disso, a atividade catalítica da CALB@AuNPs foi ligeiramente maior do que para as *sA*CALB@AuNPs, concordando com as informações obtidas por CD. Apesar do desvio padrão (SD) ser próximo para as duas amostras, o qual refere-se



à dispersão das medidas, o erro padrão (SE) da média (barras em vermelho) indica a baixa variação em relação ao SD uma vez que o SE fornece a incerteza da medida ao redor da média estimada<sup>198, 199</sup>. Portanto, a relação entre SD e SE indicou a precisão das medidas e confirmou a ligeira maior atividade catalítica para as CALB@AuNPs.

As CALB@AuNPs e as *SA*CALB@AuNPs apresentaram, respectivamente, 87% e 80% de retenção da atividade catalítica em comparação com a atividade da CALB. Ainda, as quantidades de produto formados para a CALB@AuNPs e as *SA*CALB@AuNPs foram 72% e 70%, respectivamente, maiores quando comparados à reação na ausência de catalisador. Portanto, foi evidenciado que as alterações na conformação da CALB provocadas pelas interações com as AuNPs não fizeram com que a CALB perdesse completamente as suas propriedades de catálise.

Apesar dos experimentos de atividade catalítica serem realizados com excesso de CALB, foram observados efeitos notáveis promovidos pelas AuNPs nas propriedades de catálise da enzima. Ou seja, mesmo se o resultado final da atividade catalítica das CALB@AuNPs e *SA*CALB@AuNPs teve contribuição das moléculas de CALB livres na dispersão, foi observada a redução da atividade catalítica para as moléculas de CALB adsorvidas na superfície das AuNPs. Não foi possível de obter a separação da CALB livre em dispersão nas CALB@AuNPs e *SA*CALB@AuNPs pois as dispersões que foram utilizadas são muito diluídas somado ao tamanho muito pequeno destes coloides. Com isso, não ocorreu a precipitação e separação das espécies por centrifugação.

A avaliação da atividade catalítica em função do tempo reforçou as informações obtidas pela fluorescência do Trp e CD. A interação entre a CALB e as AuNPs foi confirmada e isto causou as mudanças na conformação da CALB; no entanto, sem redução expressiva da atividade catalítica. Como visto pela fluorescência do Trp, a estrutura terciária da CALB foi alterada tanto para as CALB@AuNPs como para as *SA*CALB@AuNPs e, possivelmente, com magnitude similar, baseando-se no deslocamento muito próximo de  $\lambda_{max}$ . Por outro lado, em relação à estrutura secundária caracterizada por CD, as alterações na conformação da CALB nas *SA*CALB@AuNPs foram mais acentuadas. A redução da elipticidade no espectro de CD indicou menor quantidade de moléculas na conformação  $\alpha$ -

hélice nas  $_{SA}CALB@AuNPs$ , o que pode ser relacionado com a ligeira diminuição na atividade catalítica em comparação com as  $CALB@AuNPs$ .

Logo, algumas considerações em relação às distinções observadas são feitas a seguir. Como a CALB esteve presente em todas as etapas da síntese das AuNPs para formar as  $_{SA}CALB@AuNPs$ , isto levou a mudanças mais acentuadas na estrutura da CALB. Provavelmente, as mudanças não estão relacionadas com reações entre  $NaBH_4$  e grupos expostos na estrutura da enzima, uma vez que esse agente redutor, comumente, reage com aldeídos e cetonas e estes grupos não estão presentes nos aminoácidos constituintes da CALB <sup>200</sup>. Com isso, as interações entre AuNP-CALB promoveram outros tipos de alterações na estrutura da CALB, os quais dependeram da ordem de adição para obter as  $CALB@AuNPs$  e as  $_{SA}CALB@AuNPs$ .

Com o objetivo de demonstrar as diferenças observadas entre as  $CALB@AuNPs$  e  $_{SA}CALB@AuNPs$ , medidas de potencial zeta foram realizadas para explorar a afinidade entre a enzima e as nanopartículas (FIGURA 32) <sup>201</sup>. Além disso, a técnica de potencial zeta fornece informações importantes para o estudo da estabilidade dos sistemas coloidais <sup>202</sup>. O potencial zeta obtido para a CALB (em água, pH~5,5) foi de  $-5,27 \pm 0,1$  mV. O potencial zeta das AuNPs sintetizadas por citrato foi de  $-48,4 \pm 2,6$  mV. Este valor indicou a elevada estabilidade das AuNPs sintetizadas com citrato e a carga negativa resultou dos íons citrato presentes na superfície das AuNPs <sup>203</sup>. Para as  $CALB@AuNPs$  e  $_{SA}CALB@AuNPs$ , o potencial zeta foi de  $-27,9 \pm 1,8$  mV e  $-17,5 \pm 2,4$  mV, respectivamente.

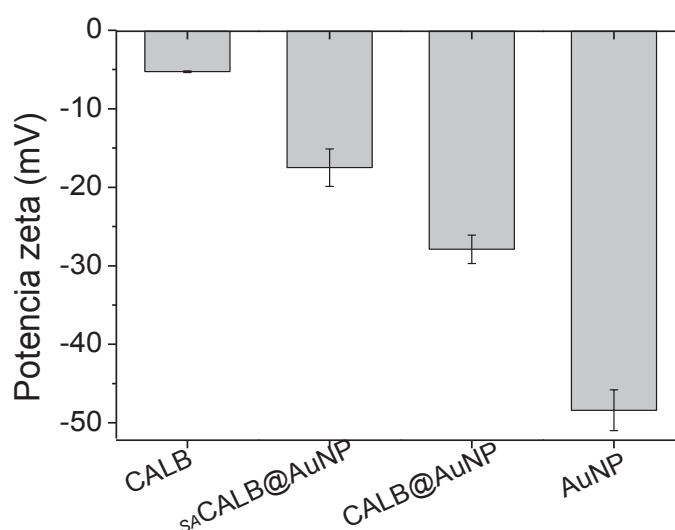


FIGURA 32. Valores de potencial zeta da CALB,  $_{SA}CALB@AuNPs$ ,  $CALB@AuNPs$  e AuNPs estabilizadas por citrato.

A redução do potencial zeta de  $-48,4 \pm 2,6$  mV das AuNPs estabilizadas por citrato para  $-27,9 \pm 1,8$  mV das CALB@AuNPs confirmou a adsorção da CALB na superfície das AuNPs <sup>203</sup>. No caso das  $_{SA}$ CALB@AuNPs, o valor de potencial zeta de  $-17,5 \pm 2,4$  mV mais negativo do que o da CALB ( $-5,27 \pm 0,1$  mV) mostrou que houve a formação das AuNPs e o recobrimento pela proteína <sup>204</sup>. O valor mais negativo de potencial zeta das CALB@AuNPs indicou estabilidade superior em relação às  $_{SA}$ CALB@AuNPs. Este comportamento está associado ao aumento das forças repulsivas entre as partículas, reduzindo a tendência de agregação dos coloides <sup>202</sup>. Além disso, a associação com as AuNPs promoveu sistemas mais estáveis para a CALB através de interações eletrostáticas na superfície das AuNPs <sup>39, 143</sup>. Como o pI da CALB é 5,8 <sup>98</sup> e o meio aquoso de pH~5,5 pode promover instabilidade para a estrutura da CALB, as CALB@AuNPs e as  $_{SA}$ CALB@AuNPs foram uma estratégia adequada para preservar a estabilidade e as propriedades da CALB sob as condições analisadas.

A técnica de eletroforese em gel também foi utilizada para coletar informações sobre as interações envolvidas e pode ser associada aos dados de potencial zeta <sup>134</sup>. No gel de eletroforese apresentado na FIGURA 33, as aplicações em A, C e E correspondem respectivamente às CALB@AuNPs,  $_{SA}$ CALB@AuNPs e CALB, onde foi observado claramente os perfis diferentes para a CALB e a CALB na presença das AuNPs. A CALB apresentou a banda característica em 33 kDa com algumas bandas de maior massa molar com intensidade menos significativas. Por outro lado, para as CALB@AuNPs e  $_{SA}$ CALB@AuNPs, nenhuma fração de proteínas foi notada no gel. Estes resultados sugerem que a interação AuNP-CALB promoveu um arranjo de estrutura complexa de tamanho maior e,  $-5,27$  mV da CALB para  $-17,5$  mV e  $-27,9$  mV na presença das AuNPs, confirmaram as alterações da superfície das AuNPs pela CALB <sup>205</sup>, criando um novo tipo de material bio-híbrido.

Para confirmar essas observações, as amostras foram previamente desnaturadas por temperatura e analisadas novamente por eletroforese em gel. As amostras foram fervidas para desnaturar a estrutura da proteína e poder relacionar com as interações com as AuNPs. As aplicações em B, D e F correspondem respectivamente às amostras desnaturadas de CALB@AuNPs,  $_{SA}$ CALB@AuNPs e CALB. Como resultado, os perfis de migração no gel de eletroforese foram diferentes daqueles apresentados pelas amostras em A, C e E, em especial para

as amostras contendo AuNPs. As CALB@AuNPs e  $_{SA}$ CALB@AuNPs fervidas apresentaram a banda característica em 33 kDa para a CALB. Portanto, isto sugere que o complexo AuNP-CALB foi desfeito, seguido do desprendimento da CALB da superfície das AuNPs. Com isso, a CALB foi capaz de migrar pelo gel, o que não ocorreu antes quando adsorvida nas CALB@AuNPs e  $_{SA}$ CALB@AuNPs. Além disso, a CALB apresentou bandas novas e mais intensas depois da desnaturação (F), indicando outros fragmentos de proteína. Por outro lado, outras bandas não foram evidenciadas na presença das AuNPs (B e D), sugerindo que a interação AuNPs-CALB foi eficiente a tal ponto de não se observar novas bandas referentes a outros fragmentos de proteína.

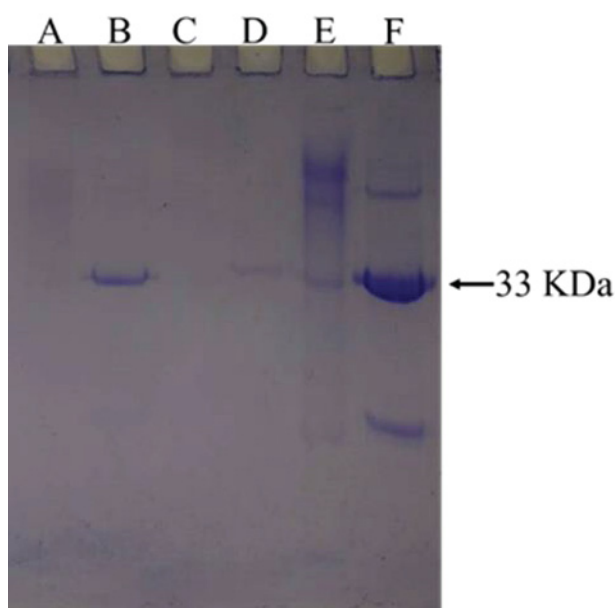


FIGURA 33. Perfil de migração em gel de eletroforese das (A) CALB@AuNPs, (C)  $_{SA}$ CALB@AuNPs e (E) CALB e as respectivas amostras previamente desnaturadas por temperatura CALB@AuNPs, (D)  $_{SA}$ CALB@AuNPs e (F) CALB.

Portanto, apesar do efeito causado pelas AuNPs na conformação da CALB caracterizadas por fluorescência do Trp e CD, os complexos AuNP-CALB formados permaneceram estáveis conforme analisado por potencial zeta e eletroforese e com resultados mais positivos para as CALB@AuNPs. Contudo, foi verificado que as interações promovidas entre as AuNPs-CALB reduziram as funções catalíticas da CALB. Dessa forma, com o objetivo de estudar as CALB@AuNPs, foram exploradas razões crescentes entre CALB/AuNPs para monitorar a relação da quantidade de AuNPs com as alterações provocadas na conformação da CALB.

Para isso, alíquotas de AuNPs estabilizadas por citrato foram adicionadas na dispersão de CALB  $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$  e investigadas por fluorescência do Trp.

Apesar dos diversos trabalhos encontrados com o objetivo de estudar as mudanças de conformação de enzimas pela interação com AuNPs por fluorescência do Trp <sup>135, 143, 191, 192, 206</sup>, não foram encontrados trabalhos estudando a interação das AuNPs com lipases.

Com as subsequentes adições das alíquotas de AuNPs na dispersão de CALB, a intensidade de fluorescência do Trp foi reduzindo continuamente (FIGURA 34). Este tipo de comportamento é causado pelo efeito de supressão que pode ser promovido pela presença de moléculas do solvente próximas aos resíduos de Trp ou por grupos vizinhos presentes na estrutura da proteína <sup>207</sup>. Com isso, a diminuição da intensidade de fluorescência foi associado à interação entre os resíduos de Trp da CALB e as AuNPs <sup>137</sup>. Medidas de potencial zeta também foram realizadas para confirmar a interação entre a CALB e as AuNPs. Os valores de potencial zeta variaram de  $-5,27 \pm 0,1$  mV até  $-34,0 \pm 1,71$  mV com as subsequentes adições das AuNPs (FIGURA 34). Evidentemente, os valores mais negativos foram originados pela adição das AuNPs que possuem potencial zeta bastante negativo ( $-48,4 \pm 2,6$  mV). Porém, associado à supressão de fluorescência que ocorreu no mesmo intervalo, a variação do potencial zeta também indicou a interação da CALB na superfície das AuNPs <sup>143</sup>.

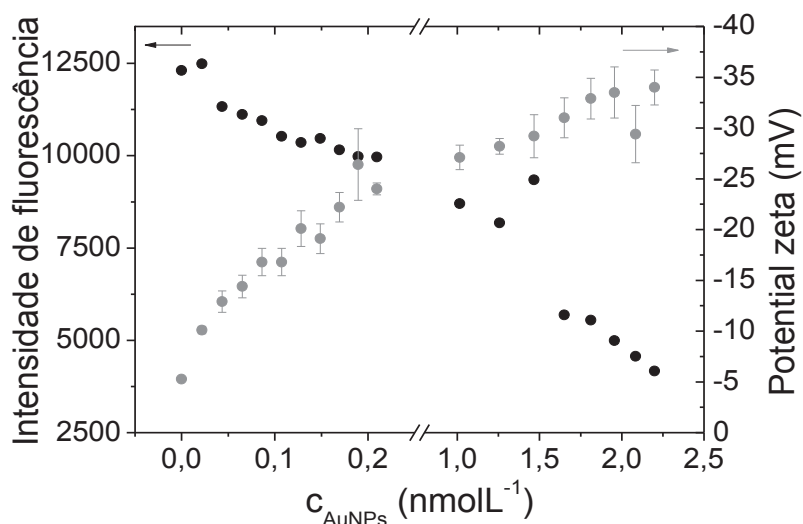


FIGURA 34. Monitoramento das mudanças na intensidade de fluorescência (círculos pretos) e nos valores de potencial zeta (círculos vermelhos) pelas subsequentes adições de AuNPs na dispersão de CALB.

O deslocamento em  $\lambda_{max}$  da fluorescência do Trp no mesmo intervalo confirmou a interação AuNP-CALB e mostrou a dependência do desenovelamento

da conformação da CALB com a quantidade de AuNPs. A FIGURA 35 mostra o deslocamento batocrômico da fluorescência do Trp com as subseqüentes adições das AuNPs. O  $\lambda_{\text{max}} = 323 \text{ nm}$  na ausência de AuNPs foi deslocado para  $\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$  com  $C_{\text{AuNPs}} = 2,2 \text{ nmol L}^{-1}$  (máxima  $C_{\text{AuNPs}}$  adicionada). A magnitude do deslocamento de  $\lambda_{\text{max}}$  da fluorescência do Trp é relacionada com a exposição dos resíduos de Trp ao meio aquoso <sup>207</sup>. A interação com as AuNPs levou à mudanças de conformação com a exposição dos resíduos de Trp da CALB e dependeu da  $C_{\text{AuNP}}$  adicionada. As adições de  $C_{\text{AuNPs}} < 1,2 \text{ nmol L}^{-1}$  apresentaram deslocamento de  $\lambda_{\text{max}}$  menos intensos, atingindo  $\lambda_{\text{max}}$  de 328 nm (espectro laranja). A partir de  $C_{\text{AuNPs}} = 1,6 \text{ nmol L}^{-1}$  (espectro rosa), os deslocamentos de  $\lambda_{\text{max}}$  foram muito mais expressivos, indicando claramente danos à conformação da CALB.

Tanto a intensidade de fluorescência como o deslocamento de  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp são ferramentas bastante sensíveis para monitorar as mudanças de conformação da CALB <sup>208</sup>. A redução da intensidade de fluorescência sem deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp é relacionado às interações que não promovem mudanças significativas na conformação da proteína <sup>143</sup>. No entanto, alterações na intensidade de fluorescência e no deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp em um mesmo processo indica que as interações promoveram mudanças na conformação da proteína <sup>209, 210</sup>. Portanto, nos sistemas analisados nesse estudo, foi confirmado que as interações AuNPs-CALB ocorreram em todas as concentrações de AuNPs adicionadas; porém, com mudanças conformacionais que dependeram da razão CALB/AuNP.

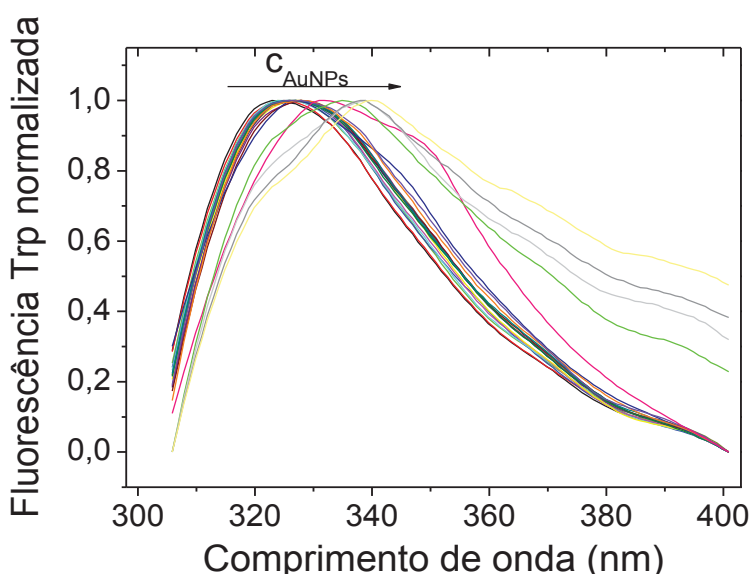


FIGURA 35. Fluorescência do Trp normalizada em função das subseqüentes adições de AuNPs na dispersão de CALB.

Por último, o centro de massa espectral ( $\langle \lambda \rangle$ ) foi calculado a fim de definir o grau de desenovelamento da proteína com as subseqüentes adições de AuNPs na dispersão de CALB. O  $\langle \lambda \rangle$  é definido pela equação 4 de média ponderal a seguir

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (\text{equação 4})$$

onde,  $F_i$  é a intensidade de fluorescência no  $\lambda_i$ . O deslocamento de  $\langle \lambda \rangle$  foi claramente mais expressivo com as maiores  $c_{\text{AuNPs}}$  (FIGURA 36). Logo, isso significa que a estrutura terciária da CALB foi parcialmente desenovelada em cada  $c_{\text{AuNPs}}$  adicionada, apresentando desenovelamentos discretos nas menores  $c_{\text{AuNPs}}$  e seguido por um aumento expressivo em maiores  $c_{\text{AuNPs}}$ .

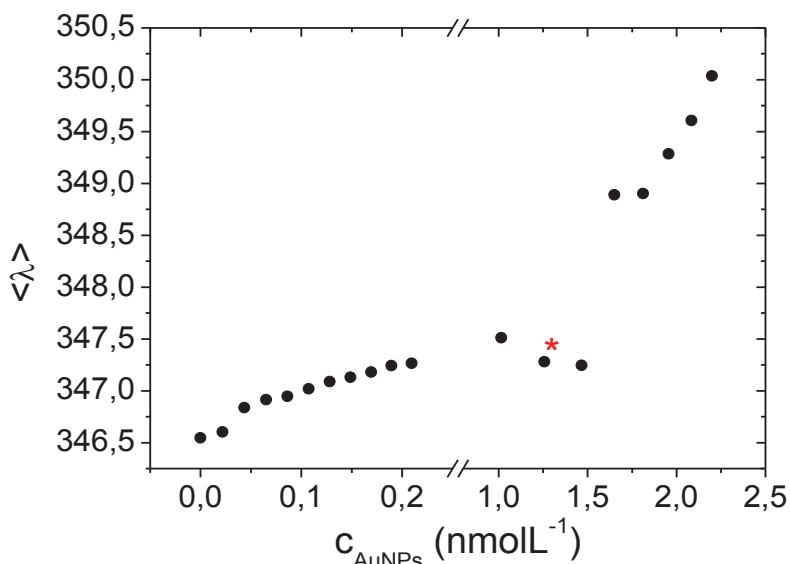


FIGURA 36. Centro de massa espectral ( $\langle \lambda \rangle$ ) em função das subseqüentes adições de AuNPs na dispersão de CALB. A estrela vermelha representa a mesma  $c_{\text{AuNPs}}$  em CALB@AuNPs analisado nos resultados anteriores.

Por último, estes experimentos de adição das alíquotas de AuNPs em CALB podem ser relacionados com as CALB@AuNPs caracterizadas nos primeiros resultados apresentados. Na mesma quantidade de AuNPs empregada ( $c_{\text{AuNPs}} = 1,3 \text{ nmol L}^{-1}$ ) para formar as CALB@AuNPs, o deslocamento de  $\langle \lambda \rangle$  mostrou que a CALB foi parcialmente desenovelada (estrela vermelha, FIGURA 36). Com isso, o comportamento de  $\langle \lambda \rangle$  está de acordo com o deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  do Trp apresentado na FIGURA 29, onde o deslocamento havia indicado a mudança de



conformação da CALB. Portanto, confirmando as avaliações feitas neste trabalho, o  $\langle \lambda \rangle$  mostrou que a CALB sofreu mudanças na sua estrutura terciária promovidas pelas interações com as AuNPs para formar as CALB@AuNPs, com parcial desenovelamento de sua estrutura, acarretando na redução da função catalítica.

#### 4.2.4. Conclusões parciais

A CALB atuou como um agente estabilizante adequado para a síntese das AuNPs, obtendo nanopartículas estáveis e esféricas ( $_{SA}CALB@AuNPs$ ). O estudo comparativo adicionando CALB em AuNPs estabilizadas por citrato previamente sintetizadas (CALB@AuNPs) apresentou características similares às  $_{SA}CALB@AuNPs$ . Por outro lado, olhando para a conformação da CALB, os efeitos causados pelas AuNPs apresentaram algumas distinções nas CALB@AuNPs e  $_{SA}CALB@AuNPs$ . As CALB@AuNPs exibiram menos mudanças na estrutura secundária da CALB em comparação com as  $_{SA}CALB@AuNPs$ , caracterizado por CD e depois confirmado pela atividade catalítica. Além disso, medidas de potencial zeta confirmaram a estabilidade coloidal superior para as CALB@AuNPs. Em seguida, diferentes razões CALB/AuNPs foram monitoradas e foi observado que a fluorescência do Trp dependeu da concentração de AuNPs e a partir de  $C_{AuNPs} = 1,2 \text{ nmol L}^{-1}$  mudanças mais expressivas na conformação da CALB foram identificadas. Portanto, por meio de diferentes técnicas de caracterização, foram analisadas o efeito da CALB na estabilização de AuNPs e, ao mesmo tempo, o efeito das AuNPs nas propriedades de conformação e atividade catalítica da CALB. Por último, este trabalho pode ser utilizado como base para futuros estudos, por um lado, empregando enzimas como agentes estabilizantes para AuNPs e inserindo bio-funcionalidades nestas partículas e, por outro lado, para o estudo de estratégias mais seguras para utilizar AuNPs em meios biológicos contendo enzimas.



#### 4.3. ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E LISOZIMA E SEU IMPACTO NA FORMAÇÃO DE FIBRAS AMILÓIDES DO TIPO FOLHAS $\beta$ -PREGUEADAS<sup>2</sup>

##### 4.3.1. Motivação do trabalho

O estudo da influência das nanopartículas no mecanismo de formação de fibras amilóides tem atraído bastante a atenção devido às fibras de proteínas amilóides serem associadas a doenças degenerativas. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são de grande interesse devido a sua superfície favorável para a adsorção de proteínas. No entanto, o entendimento do efeito das AuNPs nas fibras amilóides ainda é complexo visto que os resultados experimentais obtidos até agora têm mostrado que a adição das AuNPs pode tanto aumentar como reduzir a taxa de formação das fibras. Além disso, um dos grandes desafios não é apenas reduzir ou desfazer a agregação das proteínas, mas também reverter os processos de desenovelamento e levar as proteínas à sua conformação original. Com isso, nesta etapa do trabalho foram investigadas a formação de fibras amilóides de lisozima na presença de AuNPs assim como as interações entre as AuNPs e a lisozima tanto em sua forma fibrilar como globular. A lisozima foi utilizada por ter estrutura e propriedades muito bem conhecidas e por ser utilizada como enzima modelo para estudos *in vitro* envolvendo fibras amilóides<sup>212, 213</sup>. Para alcançar o controle sobre o processo de fibrilação ainda é necessário um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos associados ao processo de fibrilação. Dessa forma, este trabalho contribui para o estudo do uso de AuNPs nos processos de fibrilação de proteínas e fornecem informações sobre as complexas interações físico-químicas envolvidas entre as AuNPs e proteínas amilóides.

##### 4.3.2. Objetivos específicos

- Estudar o mecanismo de formação no processo de fibrilação da lisozima;
- Avaliar a influência das AuNPs em diferentes concentrações no processo de fibrilação da lisozima;

---

<sup>2</sup> 167. BARROS, H. R., KOKKINOPOULOU, M., RIEGEL-VIDOTTI, I. C., LANDFESTER, K. and THERIEN-AUBIN, H. Gold nanocolloid-protein interactions and their impact on beta-sheet amyloid fibril formation. **Rsc Advances**, 8, 980-986, 2018.

- Acompanhar a cinética do processo de fibrilação da lisozima por fluorescência do ThT e imagens de MET;
- Elucidar as interações envolvidas entre as AuNPs e a lisozima na forma globular e fibrilar;
- Avaliar as mudanças de conformação da lisozima e as interações com as AuNPs por espectroscopia de CD, fluorescência do Trp e do ThT, imagens de MET e ITC;
- Contribuir para os estudos que procuram novas alternativas para tratamentos de doenças amilóides.

#### 4.3.3. Resultados e discussão

A fibrilação da lisozima foi obtida pela adição de HCl (pH 2,0) e incubado a 60°C sob agitação *overnight* de dispersões de lisozima nativa globular. A fibrilação pode ser acompanhada pelo aumento da opacidade na dispersão (inicialmente translúcida) com a formação das estruturas amilóides, as quais são agregados de superfície hidrofóbica compostos de estruturas do tipo folha- $\beta$ , conforme apresentado na imagem da FIGURA 37. Além disso, apesar das condições severas utilizadas para a fibrilação da lisozima (60°C e pH 2,0), não houve fragmentação de sua estrutura, conforme evidenciado pelo não aparecimento de outras bandas no gel de eletroforese (FIGURA 38).

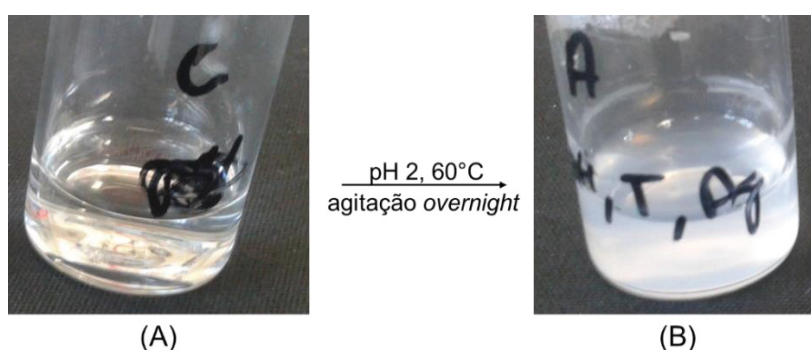


FIGURA 37. Imagens das dispersões de (A) lisozima nativa globular e após a incubação em pH 2, 60°C e agitação *overnight* para obter a (B) lisozima fibrilar.

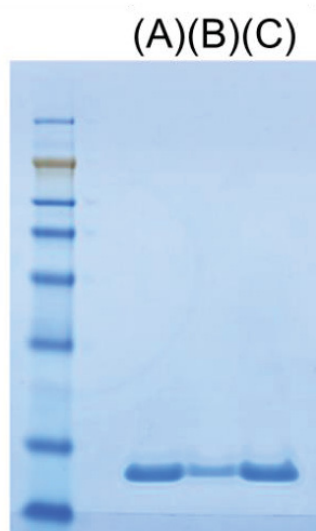


FIGURA 38. Perfil de migração em gel de eletroforese da lisozima na conformação (A) globular em pH 7, (B) globular em pH 7 e após incubação a 60°C *overnight* e (C) fibrilar em pH 2 após incubação a 60°C *overnight*. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

As AuNPs utilizadas nos estudos de interação com a lisozima globular e fibrilar foram sintetizadas na presença de MPA como agente estabilizante, apresentando banda SPR em torno de 550 nm no espectro no UV-Vis (FIGURA 39 (A)) e diâmetro médio de  $4,4 \pm 0,1$  nm obtido por imagens de MET (FIGURA 39(B)). A distribuição de tamanho das AuNPs foi confirmada por medidas de DLS, onde foi caracterizado que a dispersão coloidal tem partículas de tamanho de 3-5 nm e alguns agregados com tamanhos de até 100 nm.

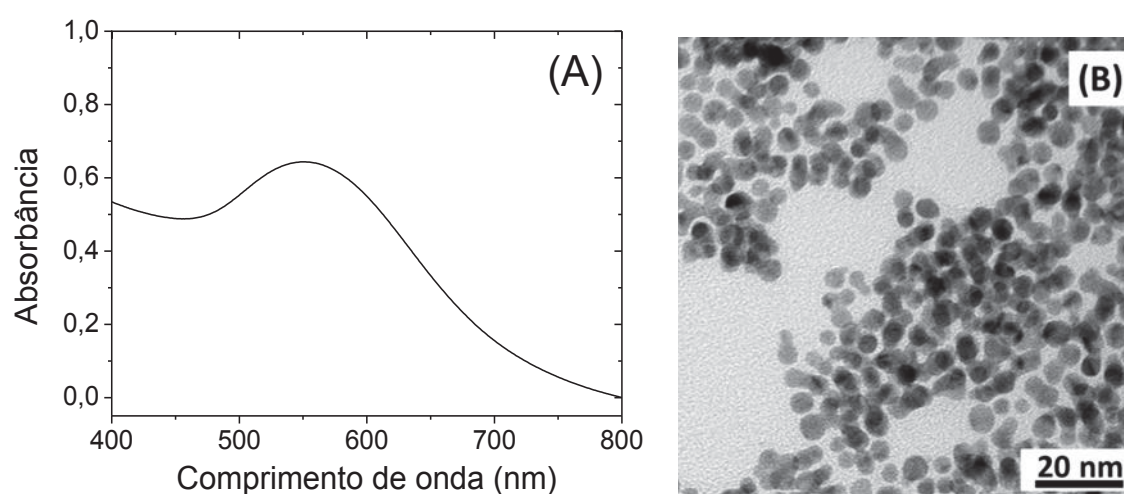


FIGURA 39. (A) Absorção da banda SPR no espectro UV-Vis e a respectiva (B) imagem de MET das AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

O efeito das AuNPs na formação e na estrutura de fibrilas amilóides de lisozima e as interações envolvidas foram investigadas seguindo duas estratégias diferentes. A estratégia 1 foi realizada pelo monitoramento da fibrilação da lisozima na presença das AuNPs a fim de investigar as interações com a lisozima globular e o seu efeito no mecanismo e cinética de formação das fibrilas. O mesmo experimento foi realizado na ausência das AuNPs como controle. Na estratégia 2, as AuNPs foram adicionadas nas fibrilas de lisozima previamente formadas a fim de estudar a interação entre as AuNPs e as fibrilas. A FIGURA 40 apresenta uma ilustração esquemática das estratégias 1 e 2 realizadas. As duas estratégias associadas contribuíram na elucidação das diferenças nas interações envolvidas entre as AuNPs e a lisozima nas suas conformações nativa globular e fibrilar  $\beta$ -amilóide.

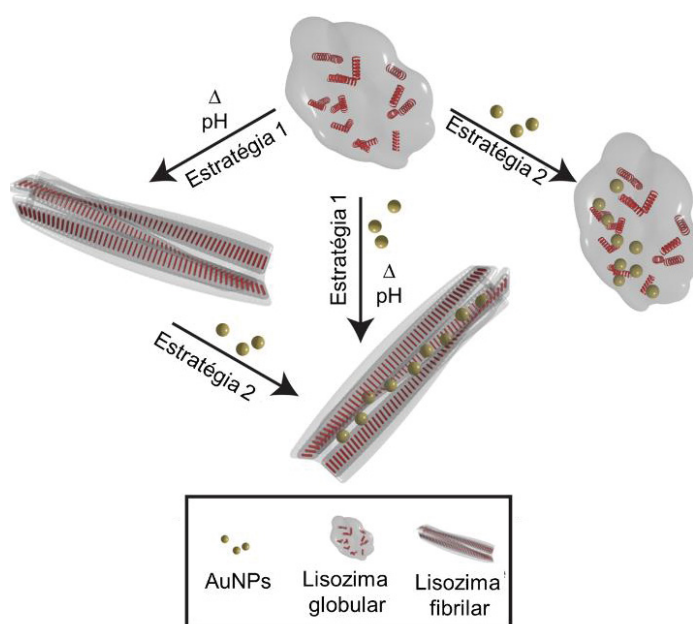


FIGURA 40. Ilustração esquemática das duas estratégias diferentes utilizadas no estudo de interação entre as AuNPs e a lisozima. Estratégia 1: fibrilação da lisozima na presença e ausência das AuNPs. Estratégia 2: estudo de interação entre as AuNPs e a lisozima na conformação globular e fibrilar. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

Seguindo a estratégia 1, a fibrilação da lisozima foi realizada na presença e na ausência das AuNPs em diferentes concentrações. As concentrações de AuNPs ( $c_{AuNPs}$ ) de 0,07, 0,3 e 3,1 mg L<sup>-1</sup> foram adicionadas em dispersões de lisozima globular e, em seguida, submetidas as condições para promover a fibrilação. A cinética de fibrilação foi monitorada pela fluorescência da tioflavina T (ThT). O ThT é uma sonda fluorescente que se liga às estruturas do tipo folha- $\beta$ , levando ao

aumento da intensidade de fluorescência<sup>121, 122</sup>. Conforme observado na FIGURA 41, no tempo = 0, não houve fluorescência em nenhuma das amostras, indicando que não houve formação de estruturas agregadas de folhas  $\beta$ -pregueadas ou fibras neste estágio. Além disso, um perfil sigmoidal foi observado com o aumento da fluorescência em função do tempo, característico de formação de fibras amilóides, para todas as amostras analisadas (FIGURA 41). Este perfil cinético foi satisfatoriamente ajustado pela equação 5.

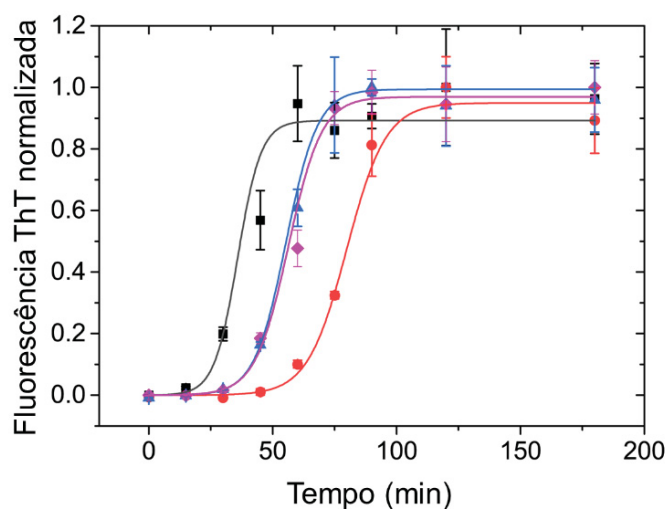


FIGURA 41. Cinética de fibrilação da lisozima monitorada pela fluorescência do ThT na presença de  $CAuNPs = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (curva preta),  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  (curva vermelha),  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  (curva azul) e  $3,1 \text{ mg L}^{-1}$  (curva rosa). As linhas contínuas correspondem ao ajuste cinético dos dados utilizando a equação 5. Reproduzido de<sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

$$F = \frac{F_0 + A}{(1 + \exp(-k(t - t_{0,5})))} \quad (\text{equação 5})$$

onde,  $F$  e  $F_0$  são as intensidades de fluorescência,  $A$  é a amplitude da transição,  $k$  é a taxa aparente de formação das fibras,  $t$  é o tempo de incubação e  $t_{0,5}$  é o ponto médio da fase de crescimento das fibras. Além disso, o tempo de atraso ( $t_{lag}$ ) pode ser obtido pela relação  $t_{lag} = t_{0,5} - 1/2k$ . Todos esses parâmetros são dependentes das condições utilizadas para promover a fibrilação, tais como a concentração de proteína, solvente, temperatura e pH. A equação 5 ajustou todas as curvas

adequadamente, fornecendo valores de  $k$  e  $t_{lag}$  que estão apresentados na TABELA 4 a seguir.

TABELA 4 – Parâmetros cinéticos da fibrilação de lisozima na presença de AuNPs.<sup>a</sup> Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

$C_{AuNP}$ (mg L <sup>-1</sup> )	$k$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{lag}$ (min)
0	$0,21 \pm 0,02$	$35 \pm 1$
0,07	$0,13 \pm 0,06$	$80 \pm 5$
0,3	$0,15 \pm 0,02$	$55 \pm 3$
3,1	$0,15 \pm 0,02$	$56 \pm 2$

<sup>a</sup> Valores obtidos pelo ajuste cinético das curvas apresentadas na FIGURA 41 utilizando a equação 4.

Conforme observado pela FIGURA 41 e os respectivos parâmetros apresentados na TABELA 4, a fase de atraso, etapa que antecede a fase de crescimento das fibras e relacionada pelo parâmetro  $t_{lag}$ , foi alterada e dependeu da  $C_{AuNPs}$ . Os valores de  $t_{lag}$  foram maiores para todas as  $C_{AuNPs}$  em comparação com a fibrilação da lisozima na ausência das AuNPs. A adição das  $C_{AuNPs} = 0,07$  mg L<sup>-1</sup> levou ao aumento do  $t_{lag}$  de  $39 \pm 1$  min para  $79 \pm 4$  min, em comparação com a fibrilação na ausência de AuNPs. As  $C_{AuNPs} = 0,3$  e  $3,1$  mg L<sup>-1</sup> também apresentaram valores de  $t_{lag}$  significativamente maiores ( $55 \pm 3$  e  $56 \pm 2$  min, respectivamente) do que a  $C_{AuNPs} = 0$  mg L<sup>-1</sup>. Portanto, o início do crescimento das fibras amilóides foi desacelerado na presença das AuNPs. Porém, o aumento em  $t_{lag}$  e os valores de  $k$  não seguiram uma relação direta com as adições de  $C_{AuNPs}$ .

A cinética de fibrilação da lisozima foi correlacionada com imagens de MET obtidas nos tempos = 0, 30 e 60 min para as  $C_{AuNPs} = 0, 0,3$  e  $3,1$  mg L<sup>-1</sup> (FIGURA 42). No tempo = 0, apenas agregados de proteína globulares foram observados em todas as amostras. A formação de protofibrilas e fibrilas foi observada no decorrer da fibrilação para todas as amostras. No tempo = 30 min, a presença de protofibrilas foi mais pronunciada na ausência das AuNPs ( $C_{AuNPs} = 0$  mg L<sup>-1</sup>) enquanto que as amostras contendo AuNPs apresentaram fibrilas coexistindo com agregados de proteína globulares. É interessante notar que neste estágio não foram observadas AuNPs livres; todas as AuNPs caracterizadas pelas imagens de MET foram encontradas incorporadas dentro das estruturas de lisozima globular ou fibrilar. Esta evidência foi confirmada pela análise de tomografia em MET, localizando precisamente a distribuição das AuNPs, conforme observado na FIGURA 43. As reconstruções 3D mostraram as AuNPs distribuídas por todo o volume das regiões



reconstruídas, dentro de ambas as estruturas globular e fibrilar da lisozima. Por último, no tempo = 60 min, foi observado a presença principalmente da estrutura fibrilar da lisozima com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$ . Por outro lado, na presença de AuNPs, algumas estruturas de lisozima globular ainda foram encontradas (FIGURA 42).

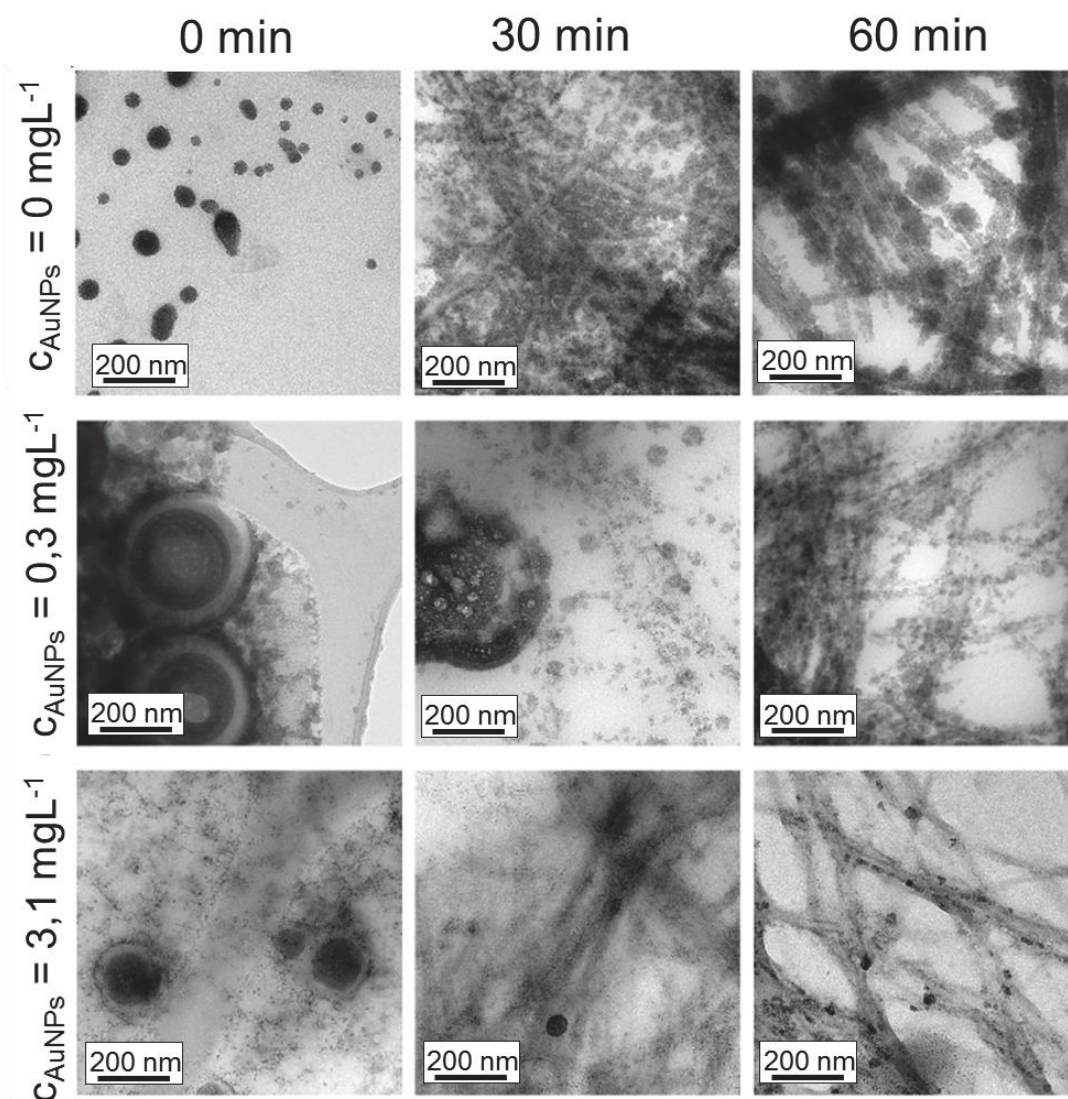


FIGURA 42. Imagens de MET obtidas durante o processo de fibrilação da lisozima nos tempos 0, 30 e 60 min com  $C_{AuNPs} = 0, 0,3$  e  $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

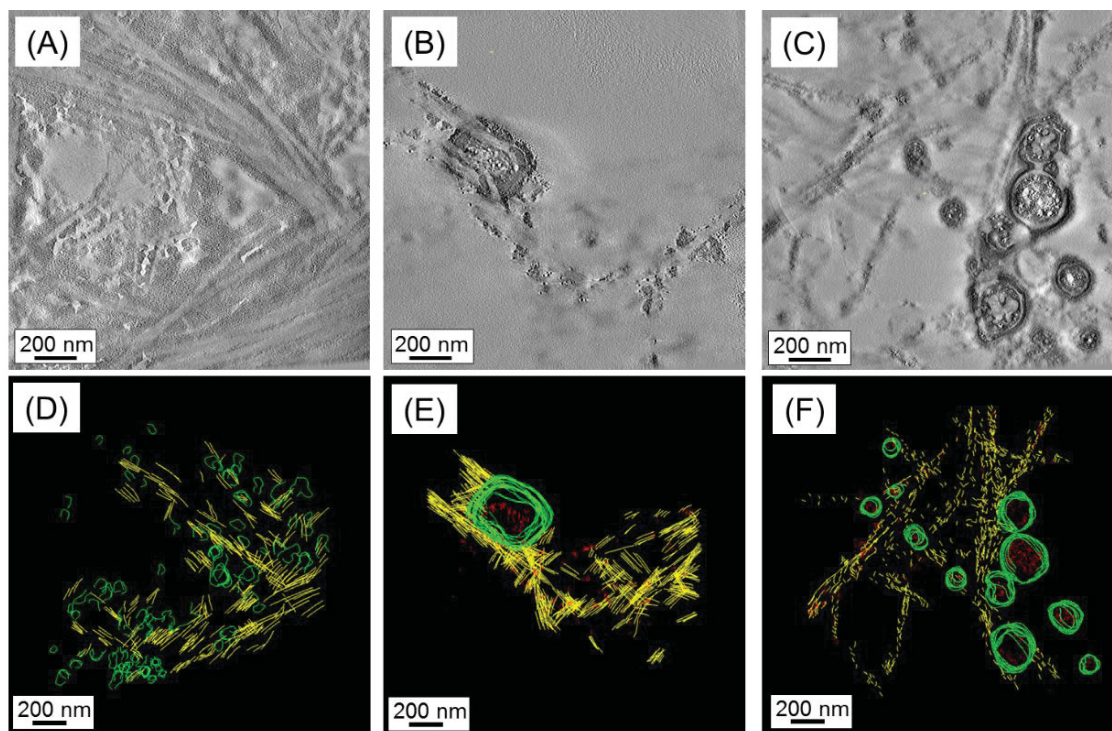


FIGURA 43. Reconstrução 3D obtidas por tomografia em MET da fibrilação da lisozima no tempo = 30 min com (A)  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$ , (B)  $C_{AuNPs} = 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  e (C)  $C_{AuNPs} = 3,1 \text{ mg L}^{-1}$  e os respectivos modelos de reconstrução 3D sobrepostos em (D), (E) e (F), onde a cor amarela representa a lisozima fibrilar, verde a lisozima globular e o vermelho as AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

Correlacionando a cinética de fibrilação monitorada pela fluorescência do ThT e pelas imagens de MET obtidas em diferentes intervalos durante a fibrilação da lisozima, é possível elucidar os seguintes efeitos provocados na formação das fibras amilóides na presença das AuNPs. Os maiores valores de  $t_{lag}$  provocados pela presença das AuNPs podem ser correlacionados com a formação dos grandes agregados de lisozima globular observados nas imagens de MET no tempo = 0. Este comportamento sugere que foi a interação entre as AuNPs e a lisozima globular no início do processo que levou à formação destas estruturas maiores. Com isso, a lisozima foi parcialmente adsorvida na superfície das AuNPs e, portanto, levou à diminuição da concentração total da lisozima livre na dispersão. A diminuição da concentração da lisozima em solução foi relacionada com o aumento do tempo de atraso na formação de fibras amilóides em outros trabalhos <sup>127, 214</sup>. Além disso, a relação com a diminuição da quantidade de proteína livre disponível e o aumento de  $t_{lag}$  na fibrilação de proteínas também foi anteriormente observado para outros tipos de nanopartículas <sup>215</sup>.



As nanopartículas podem atuar como pontos de nucleação e fibrilação de proteínas amilóides, levando ao aumento do  $t_{lag}$  <sup>215, 216</sup>. O  $t_{lag}$  pode depender da quantidade disponível e da natureza da superfície das nanopartículas, podendo inclusive levar a múltiplas camadas de proteína na superfície das nanopartículas <sup>216</sup>. Porém, neste estudo, apesar do aumento significativo em  $t_{lag}$  para todas as amostras contendo AuNPs, o efeito promovido pelas  $CAuNPs$  não foi linear. Segundo demonstrado por Cabalero-Lago *et al* (2010), ocorre uma segunda taxa de nucleação e fibrilação promovidas pelos agregados de proteína adsorvidos na superfície das nanopartículas <sup>215</sup>. Com isso, o comportamento cinético resultante pode ser explicado pelo balanço entre a primeira e a segunda taxa de nucleação observadas <sup>215</sup>. Portanto, as AuNPs retardam a fibrilação da lisozima, mas, a partir de certo ponto com o equilíbrio atingido, as AuNPs podem atuar como precursores para a fibrilação, e a formação das estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas aumenta com as maiores quantidades de AuNPs.

Para confirmar essas evidências, foram feitas medidas de dicroísmo circular (CD) ao final do processo de fibrilação FIGURA 44. As medidas de CD forneceram informações sobre as mudanças de conformação da lisozima com o processo fibrilação. O espectro da lisozima globular apresentou os dois sinais negativos em 208 e 222 nm característicos da conformação  $\alpha$ -hélice <sup>144</sup>. Após a fibrilação, na ausência e na presença das AuNPs, os espectros de todas as amostras apresentaram perfil característico de conformação folhas  $\beta$ -pregueadas, caracterizados pelo sinal positivo em 205 nm e o sinal negativo largo ao redor de 225 nm <sup>144</sup>. A elipticidade molar residual (MRE) da lisozima de conformação folhas  $\beta$ -pregueadas aumenta com a adição de maiores  $CAuNPs$ . Com isso, em conjunto com a diminuição do  $t_{lag}$ , sugere que as AuNPs promoveram a formação de maior quantidade de fibras amilóides a partir de um certo ponto posterior às fases de atraso mais longas, formando mais folhas  $\beta$ -pregueadas ao final do processo de fibrilação.

Além disso, os espectros de CD mostraram que a fibrilação da lisozima está de acordo com o mecanismo proposto para a formação de fibrilas  $\beta$ -amilóides <sup>129</sup>,

onde a lisozima globular com predominância de estruturas  $\alpha$ -hélice é desenovelada e, em seguida, as fibrilas de conformação folhas  $\beta$ -pregueadas são formadas.

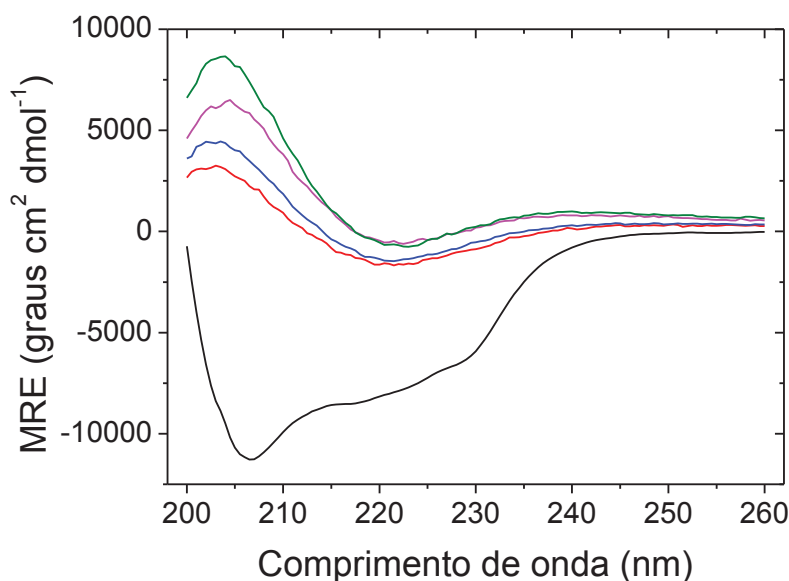


FIGURA 44. Espectro de CD da lisozima globular (espectro preto) e lisozima fibrilar ao final do processo de fibrilação contendo  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro vermelho),  $C_{AuNPs} = 0,07 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro azul),  $C_{AuNPs} = 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro rosa),  $C_{AuNPs} = 3,1 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro verde). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

Uma vez elucidada a influência das AuNPs no mecanismo e cinética durante a fibrilação da lisozima e as interações envolvidas pela estratégia 1, a estratégia 2 foi seguida a fim de elucidar a interação entre as AuNPs e a lisozima fibrilar e globular. Para isso, alíquotas de AuNPs foram adicionadas em dispersões de lisozima globular e fibrilar, variando a  $C_{AuNPs}$  de 0 a  $18 \text{ mg L}^{-1}$ , o que corresponde a uma variação de 0 a 3% da razão em massa entre as AuNPs e a lisozima. Na mesma faixa de  $C_{AuNPs}$  utilizada na estratégia 1 ( $C_{AuNPs} = 0$  a  $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), apenas uma variação pequena do sinal nos experimentos de fluorescência foi observada, em especial para as fibrilas e, por isso, foi explorado uma faixa maior de  $C_{AuNPs}$  na estratégia 2.

Primeiramente, medidas de fluorescência do ThT foram feitas nas amostras de fibras contendo  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (FIGURA 45). A adição das AuNPs levou a uma diminuição de aproximadamente 80 % na fluorescência do ThT sem apresentar deslocamento em  $\lambda_{max}$ . Com isso, como a intensidade de fluorescência do ThT reduz significativamente, foi indicado que a quantidade de estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas na lisozima fibrilar foi reduzida após a adição das

AuNPs. O mesmo não aconteceu quando foi adicionado água, indicando que a redução da fluorescência do ThT foi devido ao efeito das AuNPs e não por simplesmente efeito de diluição. Além disso, medidas de CD confirmaram essa observação (FIGURA 46). O espectro de CD da lisozima globular não foi alterado significativamente com a adição das AuNPs (FIGURA 46(A)). Por outro lado, a adição de AuNPs nas fibrilas de lisozima previamente obtidas apresentaram um espectro de CD bem diferente ao da lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (FIGURA 46(B)), sugerindo a redução das características de conformação folhas  $\beta$ -pregueadas.

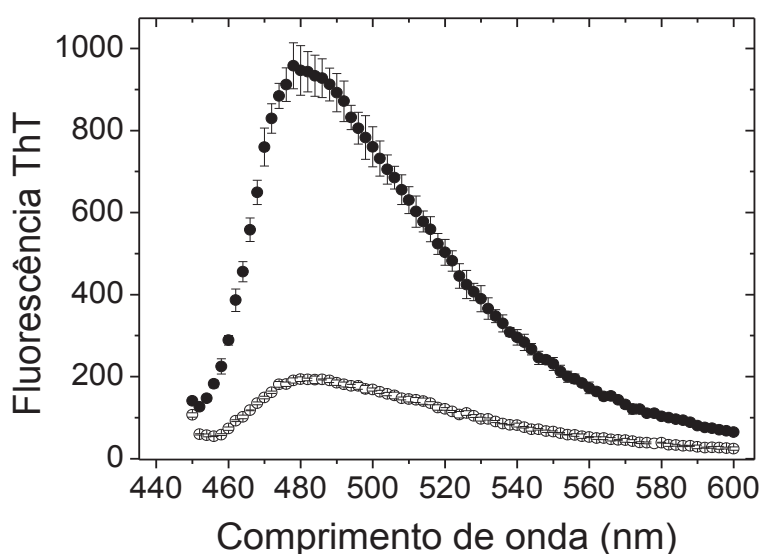


FIGURA 45. Espectro de emissão de fluorescência do ThT em lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (círculos pretos fechados) e  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (círculos pretos abertos). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

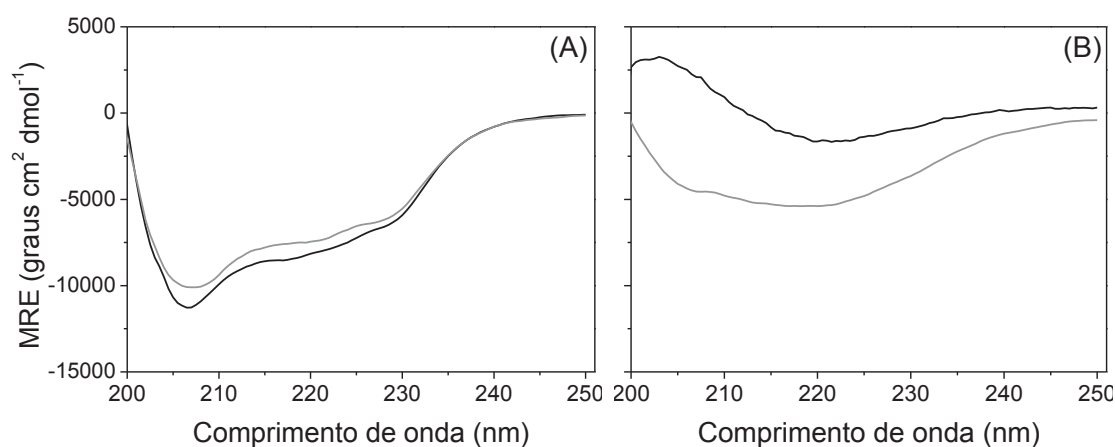


FIGURA 46. Espectros de CD da (A) lisozima globular com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro preto) e após a adição de  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro cinza) e (B) lisozima fibrilar com  $C_{AuNPs} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro preto) e após a adição de  $C_{AuNPs} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (espectro cinza). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

Além disso, as mudanças na fluorescência dos resíduos de triptofano (Trp) forneceram informações muito interessantes. A fluorescência dos resíduos de Trp de proteínas são altamente sensíveis às mudanças no seu microambiente <sup>213</sup>. A lisozima apresenta 6 resíduos de Trp <sup>217</sup>. Conforme observado na FIGURA 47, o espectro de fluorescência do Trp apresentou  $\lambda_{\text{max}}$  em 328 e 332 nm para a lisozima globular e fibrilar, respectivamente. O deslocamento para  $\lambda_{\text{max}}$  maiores, associado à diminuição da intensidade de fluorescência do Trp após a fibrilação da lisozima, indicou que a proteína sofreu mudanças de conformação, expondo os resíduos de Trp ao meio. Com a adição das AuNPs, foi observado diminuição da intensidade de fluorescência do Trp sem o deslocamento em  $\lambda_{\text{max}}$  tanto para a lisozima globular como para a fibrilar. Este fenômeno pode ser associado à supressão da fluorescência do Trp promovido pelas AuNPs sem haver a mudança de polaridade do microambiente do Trp.

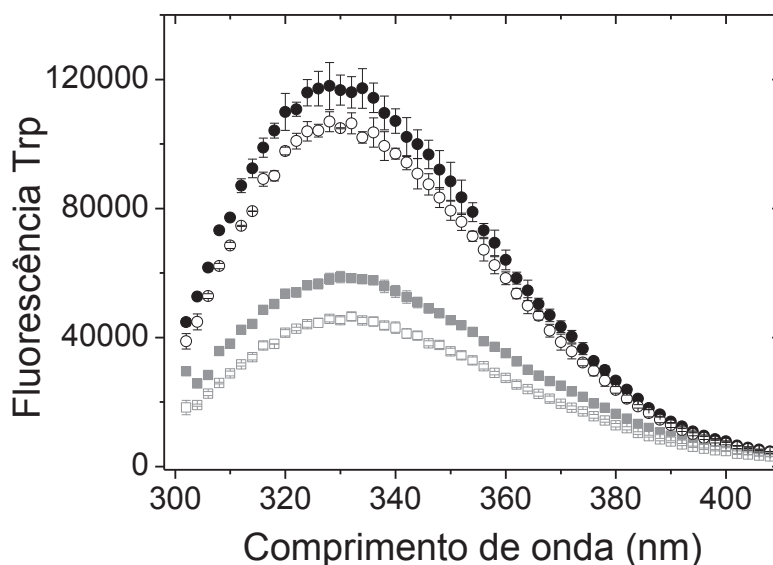


FIGURA 47. Espectro de emissão de fluorescência do Trp da lisozima globular com  $C_{\text{AuNPs}} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (círculos pretos fechados) e  $C_{\text{AuNPs}} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (círculos pretos abertos) e lisozima fibrilar com  $C_{\text{AuNPs}} = 0 \text{ mg L}^{-1}$  (quadrados cinzas fechados) e  $C_{\text{AuNPs}} = 18 \text{ mg L}^{-1}$  (quadrados cinzas abertos). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

A fluorescência intrínseca do Trp foi medida após cada adição das alíquotas das AuNPs. Dessa forma, as mudanças de conformação da lisozima foram estudadas analisando a razão entre a fluorescência do Trp em 350 nm e em 330 nm ( $F_{350}/F_{330}$ ) <sup>218</sup>, devido a relação que há entre a exposição dos resíduos de Trp e a sua  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão de fluorescência. O resíduo de Trp localizado dentro da proteína apresenta

$\lambda_{\max}$  em menores comprimentos de onda (310-330 nm) do que o Trp encontrado na superfície em contato com a água (340-350 nm) <sup>219</sup>. Dessa forma, um aumento na razão  $F_{350}/F_{330}$  indica que há mudanças estruturais na proteína devido a exposição dos resíduos de Trp para um meio mais hidrofílico. A FIGURA 48 mostra que a adição das AuNPs não resultou em grandes mudanças na razão  $F_{350}/F_{330}$  na dispersão de lisozima globular, indicando que a estrutura da lisozima globular não sofreu alterações com a adição das AuNPs. Por outro lado, a adição das AuNPs na dispersão da lisozima fibrilar levou ao aumento na razão  $F_{350}/F_{330}$  significativamente, indicando que houve a reorganização da conformação da lisozima com a exposição dos resíduos de Trp. Além disso, este comportamento também pode ser associado com uma forte interação entre os resíduos de Trp e AuNPs. Os resultados obtidos pela análise da razão  $F_{350}/F_{330}$  estão de acordo com as informações discutidas pela análise das medidas de CD apresentadas na FIGURA 46.

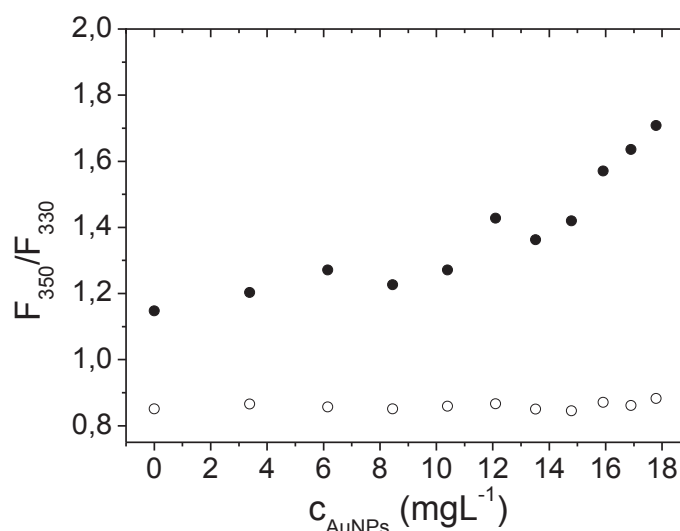


FIGURA 48. Relação da intensidade de fluorescência do Trp obtidas em  $\lambda_{\max} = 350$  e 330 nm com as subsequentes adições de  $c_{\text{AuNPs}}$  em lisozima globular (círculos abertos) e fibrilar (círculos fechados). Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

Em seguida, medidas de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizadas para analisar a natureza das interações envolvidas entre as AuNPs e a lisozima globular e fibrilar. A FIGURA 49 apresenta os dados obtidos para as medidas de ITC titulando as dispersões de lisozima globular e fibrilar em dispersões de AuNPs. De forma bastante interessante, a titulação das dispersões de lisozima globular e fibrilar em AuNPs apresentaram variação de calor com comportamentos

opostos. A interação entre a lisozima globular e as AuNPs resultou em um processo exotérmico enquanto que a interação com as fibrilas apresentou um processo endotérmico de adsorção com as AuNPs.

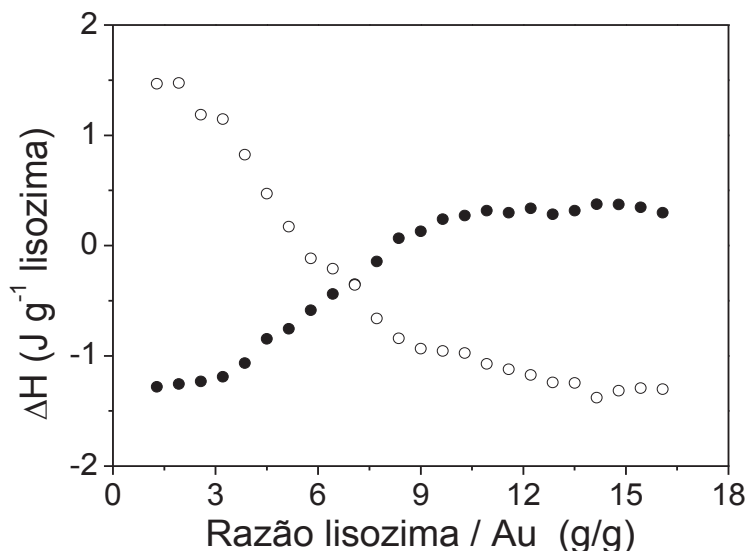


FIGURA 49. Medidas de ITC obtidas da titulação de lisozima globular (círculos fechados) e fibrilar (círculos abertos) em AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.

O comportamento de adsorção exotérmico observado com a lisozima globular sugere que as principais interações envolvidas com as AuNPs foram direcionadas por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas <sup>2, 220</sup>. Além disso, esse comportamento é característico de processos envolvendo a adsorção de proteínas na superfície de nanopartículas sem mudanças significativas da conformação da proteína <sup>2, 220</sup>. Por outro lado, o comportamento endotérmico observado para a titulação da dispersão de lisozima fibrilar em AuNPs sugere que a interação envolvida foi dirigida principalmente por fatores entrópicos <sup>2</sup>. Este tipo de comportamento na interação nanopartícula-proteína é característico de processos envolvendo a dessolvatação da proteína, onde o aumento da entropia do sistema é favorável devido à desorganização das moléculas de água ao redor das nanopartículas <sup>2</sup>. Além disso, em processos endotérmicos, as interações por ligação de hidrogênio não são favoráveis. Portanto, as interações das AuNPs com a lisozima globular e a fibrilar foram dirigidas por mecanismos de interação diferentes, conforme também havia sido observado pela razão  $F_{350}/F_{330}$  da fluorescência do Trp.

Por último, pelas imagens de MET apresentadas na FIGURA 50 foi observado que as AuNPs adicionadas estão envoltas tanto pela estrutura da lisozima globular quanto a lisozima fibrilar. As AuNPs foram localizadas dentro das estruturas de lisozima, indicando a afinidade das AuNPs com ambas as estruturas da lisozima, e não foram observadas mudanças morfológicas significativas com a incorporação das AuNPs. As reconstruções 3D obtidas por tomografia em MET evidenciaram as AuNPs inseridas dentro dos glóbulos e das fibrilas de lisozima (FIGURA 50 (B e E)). Portanto, apesar das modificações observadas na estrutura secundária e terciária da proteína, evidenciadas principalmente por CD (FIGURA 46) e fluorescência do ThT (FIGURA 45), a desagregação das fibrilas não foi observada.

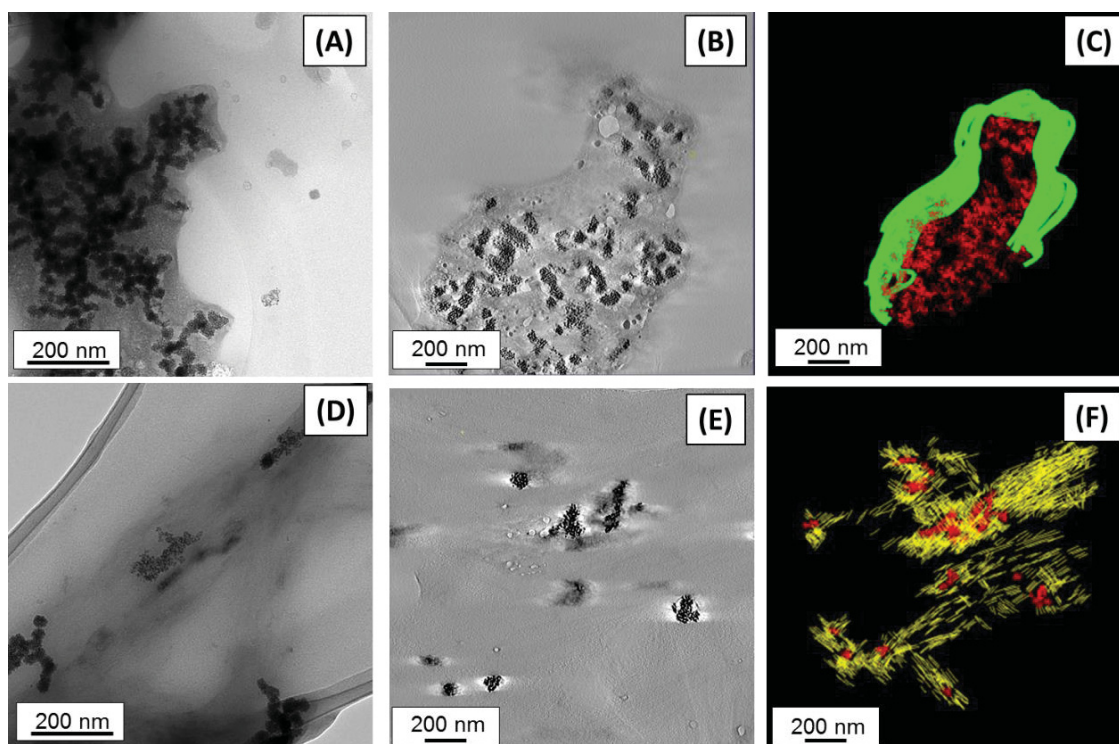


FIGURA 50. Imagens de MET das AuNPs adicionadas em (A) lisozima globular e (D) fibrilar. Reconstruções 3D obtidas por tomografia em MET das AuNPs adicionadas em lisozima (B) globular e (E) fibrilar e os respectivos modelos de reconstrução 3D sobrepostos para a lisozima (C) globular e (F) fibrilar, onde a cor amarela representa a estrutura da lisozima fibrilar, verde a lisozima globular e vermelho as AuNPs. Reproduzido de <sup>167</sup> com permissão da *Royal Society of Chemistry*.



#### 4.3.4. Conclusões parciais

Seguindo duas estratégias diferentes, foi possível elucidar as interações envolvidas e a influência provocada no mecanismo e cinética na fibrilação da lisozima na presença de AuNPs, assim como analisar as interações entre a lisozima globular e fibrilas pré-formadas com a adição de AuNPs. As AuNPs desaceleraram a fibrilação da lisozima, mas, após certo ponto com o equilíbrio atingido, a quantidade de estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas formadas aumentou com as maiores quantidades AuNPs. No entanto, a adição de AuNPs em fibrilas previamente formadas alterou as estruturas folhas  $\beta$ -pregueadas, conforme observado pela modificação na fluorescência dos resíduos de Trp e pelas medidas de CD. Os estudos cinéticos realizados pelo monitoramento da fluorescência do ThT e imagens de MET mostraram que a formação das fibrilas de lisozima na presença das AuNPs foi alterada, resultando em fases de atraso mais longas antes do iniciar o processo de desenovelamento da proteína. Além disso, medidas de CD confirmaram a transição da conformação  $\alpha$ -hélice para folhas  $\beta$ -pregueadas durante o processo de fibrilação, além de que mais lisozima com conformação folhas  $\beta$ -pregueadas foi obtida na presença das AuNPs no estágio final da fibrilação. Ainda, o estudo das interações entre as AuNPs e a lisozima globular e fibrilar, analisadas por fluorescência do Trp e ThT e confirmadas por ITC e imagens de MET, mostrou que as interações envolvidas foram direcionadas por mecanismos de interação distintos e com variação de calor com comportamentos opostos. Além disso, a adição das AuNPs levou a modificação da estrutura da lisozima fibrilar, porém a desagregação das fibrilas não foi observada. Por último, estes resultados mostraram as complexas interações físico-químicas envolvidas entre as AuNPs e proteínas amilóides.



## 5. CONCLUSÃO GERAL

As interações envolvidas na interface nano-bio entre os CTAB/AuNRs e a GA e a ChiS e entre as AuNPs esféricas e CALB ou lisozima globular e fibrilar foram identificadas e avaliadas. A investigação das propriedades de materiais nanobioconjugados e a elucidação das interações na interface nano-bio podem contribuir para o desenvolvimento de estudos que buscam novas metodologias para o uso seguro de AuNPs e para a elaboração de novos materiais com performance biológica aprimorada. Sendo assim, este trabalho contribui para o entendimento das mudanças de conformação e atividade catalítica de enzimas adsorvidas na superfície de nanomateriais, servindo como base para novos estudos que visam a aplicação de enzimas e polissacarídeos naturais na estabilização de nanomateriais e no tratamento de doenças envolvendo proteínas amilóides.

## REFERÊNCIAS

1. NEL, A. E., MADLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, E. M. V., SOMASUNDARAN, P., KLAESSIG, F., CASTRANOVA, V. and THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, 8, 543-557, 2009.
2. HUANG, R. X. and LAU, B. L. T. Biomolecule-nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, 1860, 945-956, 2016.
3. WANG, J., QUERSHI, W. A., LI, Y. Y., XU, J. X. and NIE, G. J. Analytical methods for nano-bio interface interactions. **Science China-Chemistry**, 59, 1467-1478, 2016.
4. GAGNER, J. E., SHRIVASTAVA, S., QIAN, X., DORDICK, J. S. and SIEGEL, R. W. Engineering Nanomaterials for Biomedical Applications Requires Understanding the Nano-Bio Interface: A Perspective. **Journal of Physical Chemistry Letters**, 3, 3149-3158, 2012.
5. JACKMAN, J. A., CHO, D. J., LEE, J., CHEN, J. M., BESENBACHER, F., BONNELL, D. A., HERSAM, M. C., WEISS, P. S. and CHO, N. J. Nanotechnology Education for the Global World: Training the Leaders of Tomorrow. **Acs Nano**, 10, 5595-5599, 2016.
6. DI SIA, P., **Education, Health and Ict for a Transcultural World**, vol. 237, pp. 1076-1080, 2017.
7. ZHANG, F. Grand Challenges for Nanoscience and Nanotechnology in Energy and Health. **Frontiers in Chemistry**, 5, 2017.
8. RAJESH PUROHIT, A. M., SRAJAN DALELA, VILAS WARUDKAR, KIRAN PUROHIT, SURABHI PUROHIT. Social, Environmental and Ethical Impacts of Nanotechnology. **Materials today: proceedings**, 5461-5467.
9. SERVICE, R. F. American Chemical Society meeting: Nanomaterials show signs of toxicity. **Science**, 300, 243-243, 2003.
10. ZHU, M. T., NIE, G. J., MENG, H., XIA, T., NEL, A. and ZHAO, Y. L. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. **Accounts of Chemical Research**, 46, 622-631, 2013.
11. FELIX, L. C., EDE, J. D., SNELL, D. A., OLIVEIRA, T. M., MARTINEZ-RUBI, Y., SIMARD, B., LUONG, J. H. T. and GOSS, G. G. Physicochemical properties of functionalized carbon-based nanomaterials and their toxicity to fishes. **Carbon**, 104, 78-89, 2016.
12. NEL, A., XIA, T., MENG, H., WANG, X., LIN, S. J., JI, Z. X. and ZHANG, H. Y. Nanomaterial Toxicity Testing in the 21st Century: Use of a Predictive Toxicological Approach and High-Throughput Screening. **Accounts of Chemical Research**, 46, 607-621, 2013.
13. ALKILANY, A. M., LOHSE, S. E. and MURPHY, C. J. The Gold Standard: Gold Nanoparticle Libraries To Understand the Nano-Bio Interface. **Accounts of Chemical Research**, 46, 650-661, 2013.
14. WANG, B., FENG, W. Y., CHAI, Z. F. and ZHAO, Y. L. Probing the interaction at nano-bio interface using synchrotron radiation-based analytical techniques. **Science China-Chemistry**, 58, 768-779, 2015.

15. JOGLEKAR, S. S., GHOLAP, H. M., ALEGAONKAR, P. S. and KALE, A. A. The interactions between CdTe quantum dots and proteins: understanding nano-bio interface. **Aims Materials Science**, 4, 209-222, 2017.
16. ISEULT LYNCH, A. A., DIANA BORASCHI, HUGH J. BYRNE, BENGT FADEEL, PETER GEHR, ARNO C. GUTLEB, MICHAELA KENDALL AND MANTHOS G. PAPADOPOULOS The Bio-Nano-Interface in Predicting Nanoparticle Fate and Behaviour in Living Organisms: Towards Grouping and Categorising Nanomaterials and Ensuring Nanosafety by Design. **BioNanoMaterials**, 14, 195-216, 2013.
17. LIU, J. Y. and PENG, Q. A. Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, 55, 13-27, 2017.
18. WANG, L. M. and CHEN, C. Y. Pathophysiologic mechanisms of biomedical nanomaterials. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 299, 30-40, 2016.
19. BAUMANN, V., MUHAMMED, M. A. H., BLANCH, A. J., DEY, P. and RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. Biomolecules in Metal and Semiconductor Nanoparticle Growth. **Israel Journal of Chemistry**, 56, 195-213, 2016.
20. KOKKINOPOULOU, M., SIMON, J., LANDFESTER, K., MAILANDER, V. and LIEBERWIRTH, I. Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell- interactions. **Nanoscale**, 9, 8858-8870, 2017.
21. MULLER, J., BAUER, K. N., PROZELLER, D., SIMON, J., MAILANDER, V., WURM, F. R., WINZEN, S. and LANDFESTER, K. Coating nanoparticles with tunable surfactants facilitates control over the protein corona. **Biomaterials**, 115, 1-8, 2017.
22. SCHOTTLER, S., LANDFESTER, K. and MAILANDER, V. Controlling the Stealth Effect of Nanocarriers through Understanding the Protein Corona. **Angewandte Chemie-International Edition**, 55, 8806-8815, 2016.
23. SETTANNI, G., ZHOU, J. J., SUO, T. C., SCHOTTLER, S., LANDFESTER, K., SCHMID, F. and MAILANDER, V. Protein corona composition of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanoparticles correlates strongly with the amino acid composition of the protein surface. **Nanoscale**, 9, 2138-2144, 2017.
24. MOGHADAM, T. T., RANJBAR, B., KHAJEH, K., ETEZAD, S. M., KHALIFEH, K. and GANJALIKHANY, M. R. Interaction of lysozyme with gold nanorods: conformation and activity investigations. **International Journal of Biological Macromolecules**, 49, 629-636, 2011.
25. MERG, A. D., BOATZ, J. C., MANDAL, A., ZHAO, G. P., MOKASHI-PUNEKAR, S., LIU, C., WANG, X. T., ZHANG, P. J., VAN DER WEL, P. C. A. and ROSI, N. L. Peptide-Directed Assembly of Single-Helical Gold Nanoparticle Superstructures Exhibiting Intense Chiroptical Activity. **Journal of the American Chemical Society**, 138, 13655-13663, 2016.
26. MCMILLAN, J. R., BRODIN, J. D., MILLAN, J. A., LEE, B., DE LA CRUZ, M. O. and MIRKIN, C. A. Modulating Nanoparticle Superlattice Structure Using Proteins with Tunable Bond Distributions. **Journal of the American Chemical Society**, 139, 1754-1757, 2017.
27. ANSARI, S. A. and HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, 30, 512-523, 2012.
28. LI, N., ZHAO, P. X. and ASTRUC, D. Anisotropic Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, Applications, and Toxicity. **Angewandte Chemie-International Edition**, 53, 1756-1789, 2014.

29. ZHU, H. Y., JIANG, S., CHEN, H. C. and ROCO, M. C. International perspective on nanotechnology papers, patents, and NSF awards (2000-2016). **Journal of Nanoparticle Research**, 19, 2017.
30. LI, Z. H., LEI, Z., ZHANG, J. P., LIU, D. J. and WANG, Z. X. Effects of Size, Shape, Surface Charge and Functionalization on Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. **Nano Life**, 5, 2015.
31. AMENDOLA, V., PILOT, R., FRASCONI, M., MARAGO, O. M. and IATI, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics-Condensed Matter**, 29, 2017.
32. DREADEN, E. C., ALKILANY, A. M., HUANG, X. H., MURPHY, C. J. and EL-SAYED, M. A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, 41, 2740-2779, 2012.
33. AMENDOLA, V. and MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 11, 3805-3821, 2009.
34. DANIEL, M. C. and ASTRUC, D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, 104, 293-346, 2004.
35. EUSTIS, S. and EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, 35, 209-217, 2006.
36. RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, 35, 583-592, 2006.
37. DONEGA, C. D. Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals. **Chemical Society Reviews**, 40, 1512-1546, 2011.
38. CAO, G. **Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and application**. 1<sup>a</sup> edição edn., Imperial College Press: London, 2004.
39. DE BARROS, H. R., CARDOSO, M. B., DE OLIVEIRA, C. C., FRANCO, C. R. C., BELAN, D. D., VIDOTTI, M. and RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines. **Rsc Advances**, 6, 9411-9420, 2016.
40. DE BARROS, H. R., PIOVAN, L., SASSAKI, G. L., SABRY, D. D., MATTOSO, N., NUNES, A. M., MENEGHETTI, M. R. and RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 152, 479-486, 2016.
41. TURKEVICH, J., STEVENSON, P. C. and HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, DOI: 10.1039/df9511100055, 55-&, 1951.
42. ZHAO, P. X., LI, N. and ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, 257, 638-665, 2013.
43. GIERSIG, M. and MULVANEY, P. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. **Langmuir**, 9, 3408-3413, 1993.
44. WIESNER, J. and WOKAUN, A. Anisometric gold colloids - preparation, characterization, and optical-properties. **Chemical Physics Letters**, 157, 569-575, 1989.

45. GOLE, A., ORENDORFF, C. J. and MURPHY, C. J. Immobilization of gold nanorods onto acid-terminated self-assembled monolayers via electrostatic interactions. **Langmuir**, 20, 7117-7122, 2004.
46. JANA, N. R., GEARHEART, L. and MURPHY, C. J. Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. **Chemistry of Materials**, 13, 2313-2322, 2001.
47. JANA, N. R., GEARHEART, L. and MURPHY, C. J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. **Advanced Materials**, 13, 1389-1393, 2001.
48. JANA, N. R., GEARHEART, L. and MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry B**, 105, 4065-4067, 2001.
49. NIIDOME, Y., HAINE, A. T. and NIIDOME, T. Anisotropic Gold-based Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications. **Chemistry Letters**, 45, 488-498, 2016.
50. HARRISON, E., HAMILTON, J. W. J., MACIAS-MONTERO, M. and DIXON, D. Peptide functionalized gold nanoparticles: the influence of pH on binding efficiency. **Nanotechnology**, 28, 2017.
51. MARUYAMA, T., FUJIMOTO, Y. and MAEKAWA, T. Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. **Journal of Colloid and Interface Science**, 447, 254-257, 2015.
52. CHAN, K. P., GAO, Y., GOH, J. X. W., SUSANTI, D., YEO, E. L. L., CHAO, S. H. and KAH, J. C. Y. Exploiting the Protein Corona from Cell Lysate on DNA Functionalized Gold Nanoparticles for Enhanced mRNA Translation. **Acs Applied Materials & Interfaces**, 9, 10408-10417, 2017.
53. LIZ-MARZAN, L. M. Nanometals formation and color. **Materials Today**, 7, 26-31, 2004.
54. LINK, S. and EL-SAYED, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. **International Reviews in Physical Chemistry**, 19, 409-453, 2000.
55. RODRIGUEZ-GONZALEZ, B., BURROWS, A., WATANABE, M., KIELY, C. J. and LIZ-MARZAN, L. M. Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties. **Journal of Materials Chemistry**, 15, 1755-1759, 2005.
56. KELLY, K. L., CORONADO, E., ZHAO, L. L. and SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, 107, 668-677, 2003.
57. BOISSELIER, E. and ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, 38, 1759-1782, 2009.
58. ZHANG, X. N., ZHANG, J. T., ZHANG, F. and YU, S. N. Probing the binding affinity of plasma proteins adsorbed on Au nanoparticles. **Nanoscale**, 9, 4787-4792, 2017.
59. CHARAN, S., SANJIV, K., SINGH, N., CHIEN, F. C., CHEN, Y. F., NERGUI, N. N., HUANG, S. H., KUO, C. W., LEE, T. C. and CHEN, P. L. Development of Chitosan Oligosaccharide-Modified Gold Nanorods for in Vivo Targeted Delivery and Noninvasive Imaging by NIR Irradiation. **Bioconjugate Chemistry**, 23, 2173-2182, 2012.

60. GILJOHANN, D. A., SEFEROS, D. S., DANIEL, W. L., MASSICH, M. D., PATEL, P. C. and MIRKIN, C. A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. **Angewandte Chemie-International Edition**, 49, 3280-3294, 2010.
61. SKRABALAK, S. E., CHEN, J. Y., SUN, Y. G., LU, X. M., AU, L., COBLEY, C. M. and XIA, Y. N. Gold Nanocages: Synthesis, Properties, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, 41, 1587-1595, 2008.
62. BARROS, H. R. D. **Aplicação De Goma Arábica Na Estabilização E No Controle De Tamanho De Nanopartículas De Ouro Em Meio Aquoso**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
63. GHARATAPE, A. and SALEHI, R. Recent progress in theranostic applications of hybrid gold nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 138, 221-233, 2017.
64. PENG, P., SOLOGAN, M., PASQUATO, L., GUIDA, F., PACOR, S., TOSSI, A., STELLACCI, F., MARSON, D., BOCCARDO, S., PRICL, S. and POSOCCO, P. Gold nanoparticles with patterned surface monolayers for nanomedicine: current perspectives. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, 46, 749-771, 2017.
65. KANNAN, R., ZAMBRE, A., CHANDA, N., KULKARNI, R., SHUKLA, R., KATTI, K., UPENDRAN, A., CUTLER, C., BOOTE, E. and KATTI, K. V. Functionalized radioactive gold nanoparticles in tumor therapy. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 4, 42-51, 2012.
66. DU, S. F., KENDALL, K., TOLOUEINIA, P., MEHRABADI, Y., GUPTA, G. and NEWTON, J. Aggregation and adhesion of gold nanoparticles in phosphate buffered saline. **Journal of Nanoparticle Research**, 14, 2012.
67. NELSON, D. L. C., M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª edição edn., Worth Publishers: New York, 2002.
68. PARK, Y., HONG, Y. N., WEYERS, A., KIM, Y. S. and LINHARDT, R. J. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. **Int Nanobiotechnology**, 5, 69-78, 2011.
69. LIU, X. S., HUANG, H. Y., LIU, G. Y., ZHOU, W. B., CHEN, Y. J., JIN, Q. and JI, J. Multidentate zwitterionic chitosan oligosaccharide modified gold nanoparticles: stability, biocompatibility and cell interactions. **Nanoscale**, 5, 3982-3991, 2013.
70. GLICKSMAN, M. S., R.E.; WHISTLER, R.L. E BEMILLER, J.N. **Industrial Gums, Polysaccharides and their derivatives**., Academic Press: New York, 1973.
71. PHILLIPS, P. A. W. A. G. O., **Handbook of hydrocolloids**, Woodhead Publishing: Cambridge, 2000.
72. GREIN, A., DA SILVA, B. C., WENDEL, C. F., TISCHER, C. A., SIERAKOWSKI, M. R., MOURA, A. B. D., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J., SIMAS-TOSIN, F. F. and RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Structural characterization and emulsifying properties of polysaccharides of *Acacia mearnsii* de Wild gum. **Carbohydrate Polymers**, 92, 312-320, 2013.
73. CORNELSEN, P. A., QUINTANILHA, R. C., VIDOTTI, M., GORIN, P. A. J., SIMAS-TOSIN, F. F. and RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Native and structurally modified gum arabic: Exploring the effect of the gum's microstructure in obtaining electroactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 119, 35-43, 2015.



74. TISCHER, C. A., GORIN, P. A. J. and IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, 47, 151-158, 2002.
75. GREIN-IANKOVSKI, A., RIEGEL-VIDOTTI, I. C., SIMAS-TOSIN, F. F., NARAYANAN, S., LEHENY, R. L. and SANDY, A. R. Exploring the relationship between nanoscale dynamics and macroscopic rheology in natural polymer gums. **Soft Matter**, 12, 9321-9329, 2016.
76. DICKINSON, E., ELVERSON, D. J. and MURRAY, B. S. On the film-forming and emulsion-stabilizing properties of gum arabic: dilution and flocculation aspects. **Food Hydrocolloids**, 3, 101-114, 1989.
77. FILISETTICOZZI, T. and CARPITA, N. C. MEASUREMENT OF URONIC-ACIDS WITHOUT INTERFERENCE FROM NEUTRAL SUGARS. **Analytical Biochemistry**, 197, 157-162, 1991.
78. HARTREE, E. F. DETERMINATION OF PROTEIN - MODIFICATION OF LOWRY METHOD THAT GIVES A LINEAR PHOTOMETRIC RESPONSE. **Analytical Biochemistry**, 48, 422-&, 1972.
79. IDRIS, O. H. M., WILLIAMS, P. A. and PHILLIPS, G. O. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, 12, 379-388, 1998.
80. ISLAM, A. M., PHILLIPS, G. O., SLJIVO, A., SNOWDEN, M. J. and WILLIAMS, P. A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 11, 493-505, 1997.
81. DEVI, D. K., PRATAP, S. V., HARITHA, R., SIVUDU, K. S., RADHIKA, P. and SREEDHAR, B. Gum Acacia as a Facile Reducing, Stabilizing, and Templating Agent for Palladium Nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, 121, 1765-1773, 2011.
82. ROCHA, I., LUCHT, E., RIEGEL-VIDOTTI, I. C., VIDOTTI, M. and ORTH, E. S. Kinetic Approach to Elucidate Size Controllable Features in Nanocomposites of Gold Nanoparticles and Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) in Aqueous Dispersion Stabilized by Gum Acacia. **Journal of Physical Chemistry C**, 118, 25756-25764, 2014.
83. QUINTANILHA, R. C., ORTH, E. S., GREIN-IANKOVSKI, A., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. and VIDOTTI, M. The use of gum Arabic as "Green" stabilizer of poly(aniline) nanocomposites: A comprehensive study of spectroscopic, morphological and electrochemical properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, 434, 18-27, 2014.
84. PHILLIPS, P. A. W. A. G. O., **Handbook of hydrocolloids**, Woodhead Publishing: Cambridge, 2000.
85. MUXIKA, A., ETXABIDE, A., URANGA, J., GUERRERO, P. and DE LA CABA, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 105, 1358-1368, 2017.
86. BIANCO-PELED, M. D.-P. Y. D.-P. Y. K. H. Modified chitosan: a step toward improving the properties of antibacterial food packages. **Food packaging and shelf life**, 1, 160-169, 2014.
87. TERBOJEVICH, M., CARRARO, C., COSANI, A., FOCHER, B., NAGGI, A. M. and TORRI, G. Solution studies of chitosan 6-o-sulfate. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, 190, 2847-2855, 1989.



88. BOCA, S. C., POTARA, M., TODERAS, F., STEPHAN, O., BALDECK, P. L. and ASTILEAN, S. Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, 31, 184-189, 2011.
89. CAZON, P., VELAZQUEZ, G., RAMIREZ, J. A. and VAZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, 68, 136-148, 2017.
90. VALENCIA, J. L.-M. W. M. A. M. F. M. G. ch. chapter 1, **Chitosan in the preservation of agricultural commodities**, Academic Press Elsevier: Cambirdge, pp. 3-31, 2016.
91. BORISSEVITCH, I. E. G., P.J.; SCHABERLE, F.A. **Fundamentos da Espectroscopia de Absorção Óptica**. 1ª edição edn., Editora Livraria da Física: São Paulo, 2016.
92. BERG, J. M. T., J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5ª edição edn., W H Freeman: New York, 2002.
93. GE, J., LU, D. A., WANG, J. and LIU, Z. Lipase Nanogel Catalyzed Transesterification in Anhydrous Dimethyl Sulfoxide. **Biomacromolecules**, 10, 1612-1618, 2009.
94. KISUKURI, C. M., MACEDO, A., OLIVEIRA, C. C. S., CAMARGO, P. H. C. and ANDRADE, L. H. Investigating the Influence of the Interface in Thiol-Functionalized Silver-Gold Nanoshells over Lipase Activity. **Langmuir**, 29, 15974-15980, 2013.
95. JOHNSON, B. J., ALGAR, W. R., MALANOSKI, A. P., ANCONA, M. G. and MEDINTZ, I. L. Understanding enzymatic acceleration at nanoparticle interfaces: Approaches and challenges. **Nano Today**, 9, 102-131, 2014.
96. COPELAND, R. A., **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis**, Wiley-VCH: New York, 2000.
97. SENGANI, M. and RAJESWARI, D. Gold nanosupplement in selective inhibition of methylglyoxal and key enzymes linked to diabetes. **Iet Nanobiotechnology**, 11, 861-865, 2017.
98. RABBANI, G., AHMAD, E., KHAN, M. V., ASHRAF, M. T., BHAT, R. and KHAN, R. H. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. **Rsc Advances**, 5, 20115-20131, 2015.
99. REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M. E. and MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 147-48, 237-250, 2009.
100. SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1543, 223-238, 2000.
101. BOROWIECKI, P., FABISIAK, M. and OCHAL, Z. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 1-(1,3-benzothiazol-2-ylsulfanyl)propan-2-ol with antifungal activity: a comparative study of transesterification versus hydrolysis. **Tetrahedron**, 69, 4597-4602, 2013.
102. BELLUSCI, M., FRANCOLINI, I., MARTINELLI, A., D'ILARIO, L. and PIOZZI, A. Lipase Immobilization on Differently Functionalized Vinyl-Based Amphiphilic Polymers: Influence of Phase Segregation on the Enzyme Hydrolytic Activity. **Biomacromolecules**, 13, 805-813, 2012.

103. ATTYA, M., RUSSO, A., PERRI, E. and SINDONA, G. Endogenous lipase catalyzed transesterification of olive oil fats. The formation of isomeric and oligomeric triacyleglycerols. **Journal of Mass Spectrometry**, 47, 1247-1253, 2012.
104. BUTHE, A., RECKER, T., HEINEMANN, M., HARTMEIER, W., BUCHS, J. and ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. pH-optima in lipase-catalysed esterification. **Biocatalysis and Biotransformation**, 23, 307-314, 2005.
105. Enzimas promovem produção mais limpa de biodiesel. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16390353/enzimas-promovem-producao-mais-limpa-de-biodiesel>>. Acesso em: 15/12/2017.
106. UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S. and JONES, T. A. Sequence, crystal-structure determination and refinement of 2 crystal forms of lipase-b from candida-antarctica. **Structure**, 2, 293-308, 1994.
107. IRANI, M., TORNVAL, U., GENHEDEN, S., LARSEN, M. W., HATTI-KAUL, R. and RYDE, U. Amino Acid Oxidation of Candida antarctica Lipase B Studied by Molecular Dynamics Simulations and Site-Directed Mutagenesis. **Biochemistry**, 52, 1280-1289, 2013.
108. WU, Q., SONI, P. and REETZ, M. T. Laboratory Evolution of Enantiocomplementary Candida antarctica Lipase B Mutants with Broad Substrate Scope. **Journal of the American Chemical Society**, 135, 1872-1881, 2013.
109. ZISIS, T., FREDDOLINO, P. L., TURUNEN, P., VAN TEESEING, M. C. F., ROWAN, A. E. and BLANK, K. G. Interfacial Activation of Candida antarctica Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. **Biochemistry**, 54, 5969-5979, 2015.
110. PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FUENTES, M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. and GUIBAN, J. M. Modulation of the enantioselectivity of Candida antarctica B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (+/-)-alpha-hydroxy-phenylacetic acid derivatives. **Tetrahedron-Asymmetry**, 13, 1337-1345, 2002.
111. FERNANDEZ-LORENTE, G., CABRERA, Z., GODOY, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J. M. and GUIBAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, 43, 1061-1067, 2008.
112. CABRERA, Z., FERNANDEZ-LORENTE, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J. M. and GUIBAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from Candida antarctica B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 57, 171-176, 2009.
113. WU, J. M., LI, X., YAN, Y. E., HU, Y. Y., ZHANG, Y. H. and TANG, Y. Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings. **Journal of Colloid and Interface Science**, 406, 130-138, 2013.
114. SHENG, L., WANG, J., HUANG, M. J., XU, Q. and MA, M. H. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, 92, 600-606, 2016.
115. YANG, T., LI, Z., WANG, L., GUO, C. L. and SUN, Y. J. Synthesis, characterization, and self-assembly of protein lysozyme monolayer-stabilized gold nanoparticles. **Langmuir**, 23, 10533-10538, 2007.
116. LEE-HUANG, S., HUANG, P. L., SUN, Y. T., HUANG, P. L., KUNG, H. F., BLITHE, D. L. and CHEN, H. C. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core

- preparations of human chorionic gonadotropin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96, 2678-2681, 1999.
117. KANG, J. H., KIM, Y. Y., CHANG, J. Y. and KHO, H. S. Influences of hyaluronic acid on the anticandidal activities of lysozyme and the peroxidase system. **Oral Diseases**, 17, 577-583, 2011.
  118. YE, J. L., WANG, C. B., CHEN, X. H., GUO, S. B. and SUN, M. Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77, 1261-1267, 2008.
  119. KUEHNER, D. E., ENGMANN, J., FERGG, F., WERNICK, M., BLANCH, H. W. and PRAUSNITZ, J. M. Lysozyme net charge and ion binding in concentrated aqueous electrolyte solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, 103, 1368-1374, 1999.
  120. TREXLER, A. J. and NILSSON, M. R. The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family. **Current Protein & Peptide Science**, 8, 537-557, 2007.
  121. ALVAREZ, Y. D., FAUERBACH, J. A., PELLEGGROTTI, J. V., JOVIN, T. M., JARES-ERIJMAN, E. A. and STEFANI, F. D. Influence of Gold Nanoparticles on the Kinetics of alpha-Synuclein Aggregation. **Nano Letters**, 13, 6156-6163, 2013.
  122. KAR, R. K., GAZOVA, Z., BEDNARIKOVA, Z., MROUE, K. H., GHOSH, A., ZHANG, R. Y., ULICNA, K., SIEBERT, H. C., NIFANTIEV, N. E. and BHUNIA, A. Evidence for Inhibition of Lysozyme Amyloid Fibrillization by Peptide Fragments from Human Lysozyme: A Combined Spectroscopy, Microscopy, and Docking Study. **Biomacromolecules**, 17, 1998-2009, 2016.
  123. BHASIKUTTAN, A. C. and MOHANTY, J. Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors. **Chemical Communications**, 53, 2789-2809, 2017.
  124. CHEN, G. F., XU, T. H., YAN, Y., ZHOU, Y. R., JIANG, Y., MELCHER, K. and XU, H. E. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. **Acta Pharmacologica Sinica**, 38, 1205-1235, 2017.
  125. TORRES-BUGEAU, C. M., AVILA, C. L., RAISMAN-VOZARI, R., PAPY-GARCIA, D., ITRI, R., BARBOSA, L. R. S., CORTEZ, L. M., SIM, V. L. and CHEHIN, R. N. Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Early Amyloid-like Oligomers and Their Implication in alpha-Synuclein Aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, 287, 2398-2409, 2012.
  126. GONZALEZ-LIZARRAGA, F., SOCIAS, S. B., AVILA, C. L., TORRES-BUGEAU, C. M., BARBOSA, L. R. S., BINOLFI, A., SEPULVEDA-DIAZ, J. E., DEL-BEL, E., FERNANDEZ, C. O., PAPY-GARCIA, D., ITRI, R., RAISMAN-VOZARI, R. and CHEHIN, R. N. Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodelling of alpha-synuclein oligomers towards non-oxic parallel beta-sheet structured species. **Scientific Reports**, 7, 2017.
  127. AROSIO, P., KNOWLES, T. P. J. and LINSE, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 17, 7606-7618, 2015.
  128. MAHMOUDI, M., KALHOR, H. R., LAURENT, S. and LYNCH, I. Protein fibrillation and nanoparticle interactions: opportunities and challenges. **Nanoscale**, 5, 2570-2588, 2013.
  129. ALAM, P., CHATURVEDI, S. K., SIDDIQI, M. K., RAJPOOT, R. K., AJMAL, M. R., ZAMAN, M. and KHAN, R. H. Vitamin k3 inhibits protein aggregation: Implication in the treatment of amyloid diseases. **Scientific Reports**, 6, 2016.

130. ALAM, P., SIDDIQI, K., CHTURVEDI, S. K. and KHAN, R. H. Protein aggregation: From background to inhibition strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 103, 208-219, 2017.
131. HUNG, S. Y. and FU, W. M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. **Journal of Biomedical Science**, 24, 2017.
132. WANG, Y. and NI, Y. N. Combination of UV-vis spectroscopy and chemometrics to understand protein-nanomaterial conjugate: A case study on human serum albumin and gold nanoparticles. **Talanta**, 119, 320-330, 2014.
133. MAHMOUDI, M., LYNCH, I., EJTEHADI, M. R., MONOPOLI, M. P., BOMBELLI, F. B. and LAURENT, S. Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. **Chemical Reviews**, 111, 5610-5637, 2011.
134. SAPSFORD, K. E., TYNER, K. M., DAIR, B. J., DESCHAMPS, J. R. and MEDINTZ, I. L. Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. **Analytical Chemistry**, 83, 4453-4488, 2011.
135. WANG, G. K., LIU, X. B., YAN, C. L., BAI, G. Y. and LU, Y. Probing the binding of trypsin to glutathione-stabilized gold nanoparticles in aqueous solution. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, 135, 261-266, 2015.
136. LV, M., ZHU, E. G., SU, Y. Y., LI, Q. N., LI, W. X., ZHAO, Y. and HUANG, Q. Trypsin-Gold Nanoparticle Conjugates: Binding, Enzymatic Activity, and Stability. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 39, 429-438, 2009.
137. MOMENI, L., SHAREGHI, B., SABOURY, A. A., FARHADIAN, S. and REISI, F. A spectroscopic and thermal stability study on the interaction between putrescine and bovine trypsin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 94, 145-153, 2017.
138. ITO, A. S. B., M.; PAZIN, W.M. **Fluorescência e aplicações em biofísica**. 1<sup>a</sup> edição edn., Editora da Física: São Paulo, 2016.
139. AHUMADA, M., LISSI, E., MONTAGUT, A. M., VALENZUELA-HENRIQUEZ, F., PACIONI, N. L. and ALARCON, E. I. Association models for binding of molecules to nanostructures. **Analyst**, 142, 2067-2089, 2017.
140. RAW, J. **Estudo da interação de líquidos iônicos com proteínas modelo** Mestre em ciências, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
141. ENOKI, T. A. **estudos da interação do peptideo antimicrobiano KHya1 com membranas modelo**. Doutorado, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
142. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Kluwer Academic: New York, 1999.
143. MAJI, A., BEG, M., MANDAL, A. K., DAS, S., JHA, P. K., KUMAR, A., SARWAR, S., HOSSAIN, M. and CHAKRABARTI, P. Spectroscopic interaction study of human serum albumin and human hemoglobin with Mersilea quadrifolia leaves extract mediated silver nanoparticles having antibacterial and anticancer activity. **Journal of Molecular Structure**, 1141, 584-592, 2017.
144. MOHAMMADI, F., MAHMUDIAN, A., MOEENI, M. and HASSANI, L. Inhibition of amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme by the natural and synthetic curcuminoids. **Rsc Advances**, 6, 23148-23160, 2016.

145. PAUL, B. K., GHOSH, N. and MUKHERJEE, S. Binding Interaction of a Prospective Chemotherapeutic Antibacterial Drug with beta-Lactoglobulin: Results and Challenges. **Langmuir**, 30, 5921-5929, 2014.
146. QIN, Z., SUN, Y., JIA, B. H., WANG, D., MA, Y. and MA, G. Kinetic Mechanism of Thioflavin T Binding onto the Amyloid Fibril of Hen Egg White Lysozyme. **Langmuir**, 33, 5398-5405, 2017.
147. YAO, H., WYNENDAELE, E., XU, X. L., KOSGEI, A. and DE SPIEGELEER, B. Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 147, 50-64, 2018.
148. KELLY, S. M., JESS, T. J. and PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, 1751, 119-139, 2005.
149. BRAHMS, S. and BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular-dichroism. **Journal of Molecular Biology**, 138, 149-178, 1980.
150. NURANI, G., RADFORD, M., CHARALAMBOUS, K., O'REILLY, A. O., CRONIN, N. B., HAQUE, S. and WALLACE, B. A. Tetrameric bacterial sodium channels: Characterization of structure, stability, and drug binding. **Biochemistry**, 47, 8114-8121, 2008.
151. YADAV, S., GUPTA, S. and SAXENA, J. K. Monitoring thermal and chemical unfolding of Brugia malayi calreticulin using fluorescence and Circular Dichroism spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, 102, 986-995, 2017.
152. CHAKRABORTY, S., JOSHI, P., SHANKER, V., ANSARI, Z. A., SINGH, S. P. and CHAKRABARTI, P. Contrasting Effect of Gold Nanoparticles and Nanorods with Different Surface Modifications on the Structure and Activity of Bovine Serum Albumin. **Langmuir**, 27, 7722-7731, 2011.
153. WANG, S. T., LIN, Y. Y., TODOROVA, N., XU, Y. Q., MAZO, M., RANA, S., LEONARDO, V., AMDURSKY, N., SPICER, C. D., ALEXANDER, B. D., EDWARDS, A. A., MATTHEWS, S. J., YAROVSKY, I. and STEVENS, M. M. Facet-Dependent Interactions of Islet Amyloid Polypeptide with Gold Nanoparticles: Implications for Fibril Formation and Peptide-Induced Lipid Membrane Disruption. **Chemistry of Materials**, 29, 1550-1560, 2017.
154. YANG, J. A., LIN, W., WOODS, W. S., GEORGE, J. M. and MURPHY, C. J. alpha-Synuclein's Adsorption, Conformation, and Orientation on Cationic Gold Nanoparticle Surfaces Seeds Global Conformation Change. **Journal of Physical Chemistry B**, 118, 3559-3571, 2014.
155. OMANOVIC-MIKLICANIN, E., MANFIELD, I. and WILKINS, T. Application of isothermal titration calorimetry in evaluation of protein-nanoparticle interactions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 127, 605-613, 2017.
156. WINZEN, S., SCHOETTLER, S., BAIER, G., ROSENAUER, C., MAILAENDER, V., LANDFESTER, K. and MOHR, K. Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. **Nanoscale**, 7, 2992-3001, 2015.
157. FREYER, M. W. and LEWIS, E. A., **Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 in Vitro Techniques**, vol. 84, pp. 79-113, 2008.



158. WERBER, L., PREISS, L. C., LANDFESTER, K., MUNOZ-ESPI, R. and MASTAI, Y. Isothermal Titration Calorimetry of Chiral Polymeric Nanoparticles. **Chirality**, 27, 613-618, 2015.
159. BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.
160. DA SILVA, M. G. A., NUNES, A. M., MENEGHETTI, S. M. P. and MENEGHETTI, M. R. New aspects of gold nanorod formation via seed-mediated method. **Comptes Rendus Chimie**, 16, 640-650, 2013.
161. SAU, T. K. and MURPHY, C. J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. **Langmuir**, 20, 6414-6420, 2004.
162. PIELLA, J., BASTUS, N. G. and PUNTES, V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. **Chemistry of Materials**, 28, 1066-1075, 2016.
163. KESIK, M., KANIK, F. E., HIZALAN, G., KOZANOGLU, D., ESENTURK, E. N., TIMUR, S. and TOPPARE, L. A functional immobilization matrix based on a conducting polymer and functionalized gold nanoparticles: Synthesis and its application as an amperometric glucose biosensor. **Polymer**, 54, 4463-4471, 2013.
164. GILL, S. C. and VONHIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino-acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, 182, 319-326, 1989.
165. MAHMOUDI, M., QUINLAN-PLUCK, F., MONOPO, M. P., SHEIBANI, S., VALI, H., DAWSON, K. A. and LYNCH, I. Influence of the Physiochemical Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Amyloid beta Protein Fibrillation in Solution. **ACS Chemical Neuroscience**, 4, 475-485, 2013.
166. LUKACH, A. **Structure and Properties of Nano- and Meso-Scale Materials Prepared by Designed Self-Assembly of Nanoparticles**. Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, 2015.
167. BARROS, H. R., KOKKINOPOULOU, M., RIEGEL-VIDOTTI, I. C., LANDFESTER, K. and THERIEN-AUBIN, H. Gold nanocolloid-protein interactions and their impact on beta-sheet amyloid fibril formation. **Rsc Advances**, 8, 980-986, 2018.
168. YU, C. M., ZHU, Z. K., WANG, Q. H., GU, W., BAO, N. and GU, H. Y. A disposable indium-tin-oxide sensor modified by gold nanorod-chitosan nanocomposites for the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cancer cells. **Chemical Communications**, 50, 7329-7331, 2014.
169. XIE, Y., GUO, S. M., JI, Y. L., GUO, C. F., LIU, X. F., CHEN, Z. Y., WU, X. C. and LIU, Q. Self-Assembly of Gold Nanorods into Symmetric Superlattices Directed by OH-Terminated Hexa(ethylene glycol) Alkanethiol. **Langmuir**, 27, 11394-11400, 2011.
170. LAN, X., SU, Z. M., ZHOU, Y. D., MEYER, T., KE, Y. G., WANG, Q. B., CHIU, W., LIU, N., ZOU, S. L., YAN, H. and LIU, Y. Programmable Supra-Assembly of a DNA Surface Adapter for Tunable Chiral Directional Self-Assembly of Gold Nanorods. **Angewandte Chemie-International Edition**, 56, 14632-14636, 2017.
171. JOHNSON, C. J., DUJARDIN, E., DAVIS, S. A., MURPHY, C. J. and MANN, S. Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, 12, 1765-1770, 2002.

172. BOCA, S. C. and ASTILEAN, S. Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags. **Nanotechnology**, 21, 2010.
173. RAYAVARAPU, R. G., PETERSEN, W., HARTSUIKER, L., CHIN, P., JANSSEN, H., VAN LEEUWEN, F. W. B., OTTO, C., MANOHAR, S. and VAN LEEUWEN, T. G. In vitro toxicity studies of polymer-coated gold nanorods. **Nanotechnology**, 21, 2010.
174. HAMON, C., BIZIEN, T., ARTZNER, F., EVEN-HERNANDEZ, P. and MARCHI, V. Replacement of CTAB with peptidic ligands at the surface of gold nanorods and their self-assembling properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, 424, 90-97, 2014.
175. ERATHODIYIL, N. and YING, J. Y. Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications. **Accounts of Chemical Research**, 44, 925-935, 2011.
176. LEHR, C. M., BOUWSTRA, J. A., SCHACHT, E. H. and JUNGINGER, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, 78, 43-48, 1992.
177. ZHAROV, V. P., MERCER, K. E., GALITOVSKAYA, E. N. and SMELTZER, M. S. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. **Biophysical Journal**, 90, 619-627, 2006.
178. LI, J. H., FENG, H. B., LI, J., FENG, Y. L., ZHANG, Y. Q., JIANG, J. B. and QIAN, D. Fabrication of gold nanoparticles-decorated reduced graphene oxide as a high performance electrochemical sensing platform for the detection of toxicant Sudan I. **Electrochimica Acta**, 167, 226-236, 2015.
179. NETHI, S. K., MUKHERJEE, S., VEERIAH, V., BARUI, A. K., CHATTERJEE, S. and PATRA, C. R. Bioconjugated gold nanoparticles accelerate the growth of new blood vessels through redox signaling. **Chemical Communications**, 50, 14367-14370, 2014.
180. NIKOOBAKHT, B. and EL-SAYED, M. A. Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. **Langmuir**, 17, 6368-6374, 2001.
181. SUI, Z. M., CHEN, X., WANG, L. Y., XU, L. M., ZHUANG, W. C., CHAI, Y. C. and YANG, C. J. Capping effect of CTAB on positively charged Ag nanoparticles. **Physica E-Low-Dimensional Systems & Nanostructures**, 33, 308-314, 2006.
182. TANG, J. Q., HUANG, J. M. and MAN, S. Q. Preparation of gold nanoparticles by surfactant-promoted reductive reaction without extra reducing agent. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 103, 349-355, 2013.
183. CAMPBELL, R. A., PARKER, S. R. W., DAY, J. P. R. and BAIN, C. D. External reflection FTIR spectroscopy of the cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) on an overflowing cylinder. **Langmuir**, 20, 8740-8753, 2004.
184. INNOCENZI, P., FALCARO, P., GROSSO, D. and BABONNEAU, F. Order-disorder transitions and evolution of silica structure in self-assembled mesostructured silica films studied through FTIR spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, 107, 4711-4717, 2003.
185. ESPINOSA-ANDREWS, H., SANDOVAL-CASTILLA, O., VAZQUEZ-TORRES, H., VERNON-CARTER, E. J. and LOBATO-CALLEROS, C. Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and



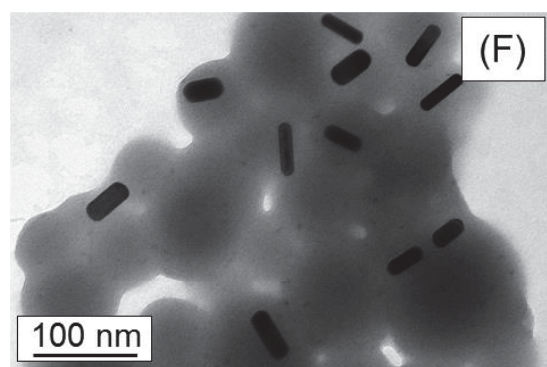
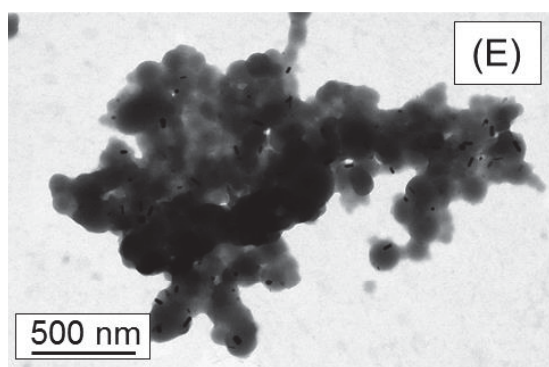
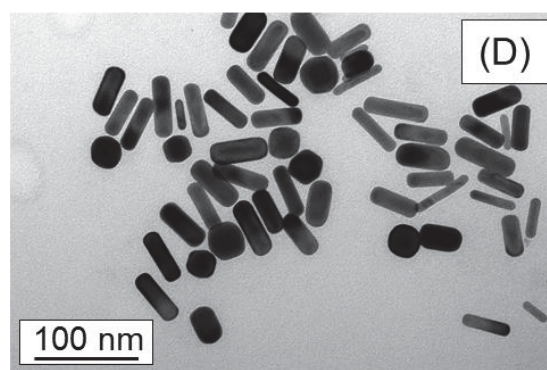
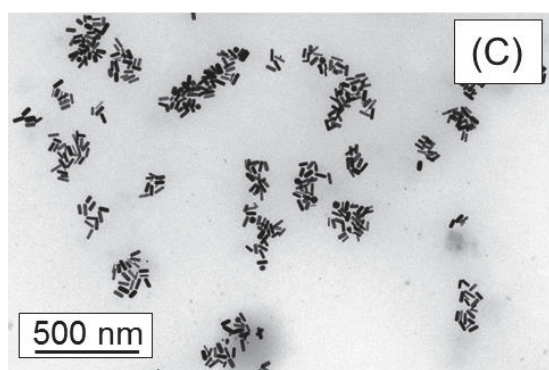
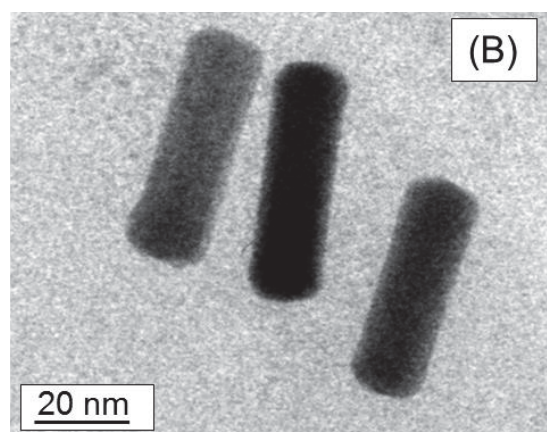
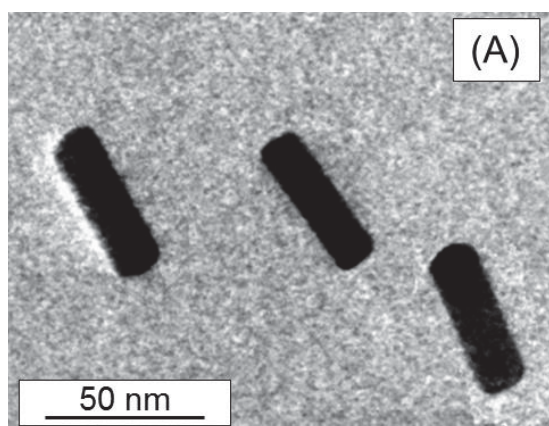
- characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, 79, 541-546, 2010.
186. KARPOVICH, D. S. and BLANCHARD, G. J. Direct measurement of the adsorption-kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface. **Langmuir**, 10, 3315-3322, 1994.
  187. LEFF, D. V., BRANDT, L. and HEATH, J. R. Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines. **Langmuir**, 12, 4723-4730, 1996.
  188. TEMPLETON, A. C., PIETRON, J. J., MURRAY, R. W. and MULVANEY, P. Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. **Journal of Physical Chemistry B**, 104, 564-570, 2000.
  189. ZAKARIA, H. M., SHAH, A., KONIECZNY, M., HOFFMANN, J. A., NIJDAM, A. J. and REEVES, M. E. Small Molecule- and Amino Acid-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, 29, 7661-7673, 2013.
  190. JOHNSTON, B. D., KREYLING, W. G., PFEIFFER, C., SCHAFFLER, M., SARIOGLU, H., RISTIG, S., HIRN, S., HABERL, N., THALHAMMER, S., HAUCK, S. M., SEMMLER-BEHNKE, M., EPPLE, M., HUHN, J., DEL PINO, P. and PARAK, W. J. Colloidal Stability and Surface Chemistry Are Key Factors for the Composition of the Protein Corona of Inorganic Gold Nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, 27, 2017.
  191. ALEX, S. A., CHAKRABORTY, D., CHANDRASEKARAN, N. and MUKHERJEE, A. A comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization. **Rsc Advances**, 6, 52683-52694, 2016.
  192. RAVIKUMAR, S., SREEKANTH, T. V. M. and EOM, I. Y. Interaction Studies of Greenly Synthesized Gold Nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA) Using Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 15, 9617-9623, 2015.
  193. VENDITTI, I., PALOCCI, C., CHRONOPOULOU, L., FRATODDI, I., FONTANA, L., DIOCIAIUTI, M. and RUSSO, M. V. Candida rugosa lipase immobilization on hydrophilic charged gold nanoparticles as promising biocatalysts: Activity and stability investigations. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, 131, 93-101, 2015.
  194. TANG, Y., ZHANG, W., LIU, J., ZHANG, L., HUANG, W., HUO, F. W. and TIAN, D. B. A plasmonic nanosensor for lipase activity based on enzyme-controlled gold nanoparticles growth in situ. **Nanoscale**, 7, 6039-6044, 2015.
  195. KISUKURI, C. M., PALMEIRA, D. J., RODRIGUES, T. S., CAMARGO, P. H. C. and ANDRADE, L. H. Bimetallic Nanoshells as Platforms for Metallo- and Biometallo-Catalytic Applications. **Chemcatchem**, 8, 171-179, 2016.
  196. WU, C. S., WU, C. T., YANG, Y. S. and KO, F. H. An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles. **Chemical Communications**, DOI: 10.1039/b810889g, 5327-5329, 2008.
  197. PACE, C. N., TREVINO, S., PRABHAKARAN, E. and SCHOLTZ, J. M. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, 359, 1225-1234, 2004.

198. ALTMAN, D. G. and BLAND, J. M. Statistics notes - Standard deviations and standard errors. **British Medical Journal**, 331, 903-903, 2005.
199. ALTMAN, D. G. Statistical reviewing for medical journals. **Statistics in Medicine**, 17, 2661-2674, 1998.
200. CLAYDEN, J., GREEVES, N.J., WARREN, S. ch. 23, **Organic Chemistry**. 2nd edn., Oxford University Press: Oxford, 2012.
201. SCHULTZ, N., METREVELI, G., FRANZREB, M., FRIMMEL, F. H. and SYLDATK, C. Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, 66, 39-44, 2008.
202. AGHILI, Z., TAHERI, S., ZEINABAD, H. A., PISHKAR, L., SABOURY, A. A., RAHIMI, A. and FALAHATI, M. Investigating the Interaction of Fe Nanoparticles with Lysozyme by Biophysical and Molecular Docking Studies. **Plos One**, 11, 2016.
203. SCHOLLBACH, M., ZHANG, F. J., ROOSEN-RUNGE, F., SKODA, M. W. A., JACOBS, R. M. J. and SCHREIBER, F. Gold nanoparticles decorated with oligo(ethylene glycol) thiols: Surface charges and interactions with proteins in solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, 426, 31-38, 2014.
204. DURAN, N., MARCATO, P. D., DURAN, M., YADAV, A., GADE, A. and RAI, M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90, 1609-1624, 2011.
205. SHIKHA, S., THAKUR, K. G. and BHATTACHARYYA, M. S. Facile fabrication of lipase to amine functionalized gold nanoparticles to enhance stability and activity. **Rsc Advances**, 7, 42845-42855, 2017.
206. ADEYEMI, O. S. and WHITELEY, C. G. Interaction of metal nanoparticles with recombinant arginine kinase from *Trypanosoma brucei*: Thermodynamic and spectrofluorimetric evaluation. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, 1840, 701-706, 2014.
207. VENUGOPAL, A., KUMAR, C. S., KUMAR, N. S. and SWAMY, M. J. Kinetic and biophysical characterization of a lysosomal alpha-L-fucosidase from the fresh water mussel, *Lamellidens corrianus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 104, 432-441, 2017.
208. RABBANI, G., AHMAD, E., ZAIDI, N., FATIMA, S. and KHAN, R. H. pH-Induced Molten Globule State of *Rhizopus niveus* Lipase is More Resistant Against Thermal and Chemical Denaturation Than Its Native State. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 62, 487-499, 2012.
209. DANTAS, M. D. D., TENORIO, H. D., LOPES, T. I. B., PEREIRA, H. J. V., MARSAIOLI, A. J., FIGUEIREDO, I. M. and SANTOS, J. C. C. Interactions of tetracyclines with ovalbumin, the main allergen protein from egg white: Spectroscopic and electrophoretic studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 102, 505-514, 2017.
210. TANG, L., LI, S., BI, H. N. and GAO, X. Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with three proteins. **Food Chemistry**, 196, 550-559, 2016.
211. MOHANA-BORGES, R., SILVA, J. L. and DE PRAT-GAY, G. Protein folding in the absence of chemical denaturants - Reversible pressure denaturation of the noncovalent complex formed by the association of two protein fragments. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 7732-7740, 1999.

212. SWAMINATHAN, R., RAVI, V. K., KUMAR, S., KUMAR, M. V. S. and CHANDRA, N., **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Vol 84**, vol. 84, pp. 63-111, 2011.
213. CHAARI, A., FAHY, C., CHEVILLOT-BIRAUD, A. and RHOLAM, M. Insights into Kinetics of Agitation-Induced Aggregation of Hen Lysozyme under Heat and Acidic Conditions from Various Spectroscopic Methods. **Plos One**, 10, 2015.
214. KUMAR, E. K., PRASAD, D. K. and PRABHU, N. P. Concentration dependent switch in the kinetic pathway of lysozyme fibrillation: Spectroscopic and microscopic analysis. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 183, 187-194, 2017.
215. CABALEIRO-LAGO, C., QUINLAN-PLUCK, F., LYNCH, I., DAWSON, K. A. and LINSE, S. Dual Effect of Amino Modified Polystyrene Nanoparticles on Amyloid beta Protein Fibrillation. **Acs Chemical Neuroscience**, 1, 279-287, 2010.
216. LINSE, S., CABALEIRO-LAGO, C., XUE, W. F., LYNCH, I., LINDMAN, S., THULIN, E., RADFORD, S. E. and DAWSON, K. A. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104, 8691-8696, 2007.
217. FORMOSO, C. F., L. S. Tryptophan fluorescence lifetimes in lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, 250, 3738-3745, 1975.
218. PATRICK GARIDEL, M. H., STEFAN BASSARAB, MICHAEL WEICHEL. A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. **Biotechnology Journal**, 3, 1201–1211, 2008.
219. BURSTEIN, E. A., VEDENKINA, N. S. and IVKOVA, M. N. Fluorescence and location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochemistry and Photobiology**, 18, 263-279, 1973.
220. DE CASTRO, C. E., MATTEI, B., RISKE, K. A., JAGER, E., JAGER, A., STEPANEK, P. and GIACOMELLI, F. C. Understanding the Structural Parameters of Biocompatible Nanoparticles Dictating Protein Fouling. **Langmuir**, 30, 9770-9779, 2014.

**APÊNDICE 1**

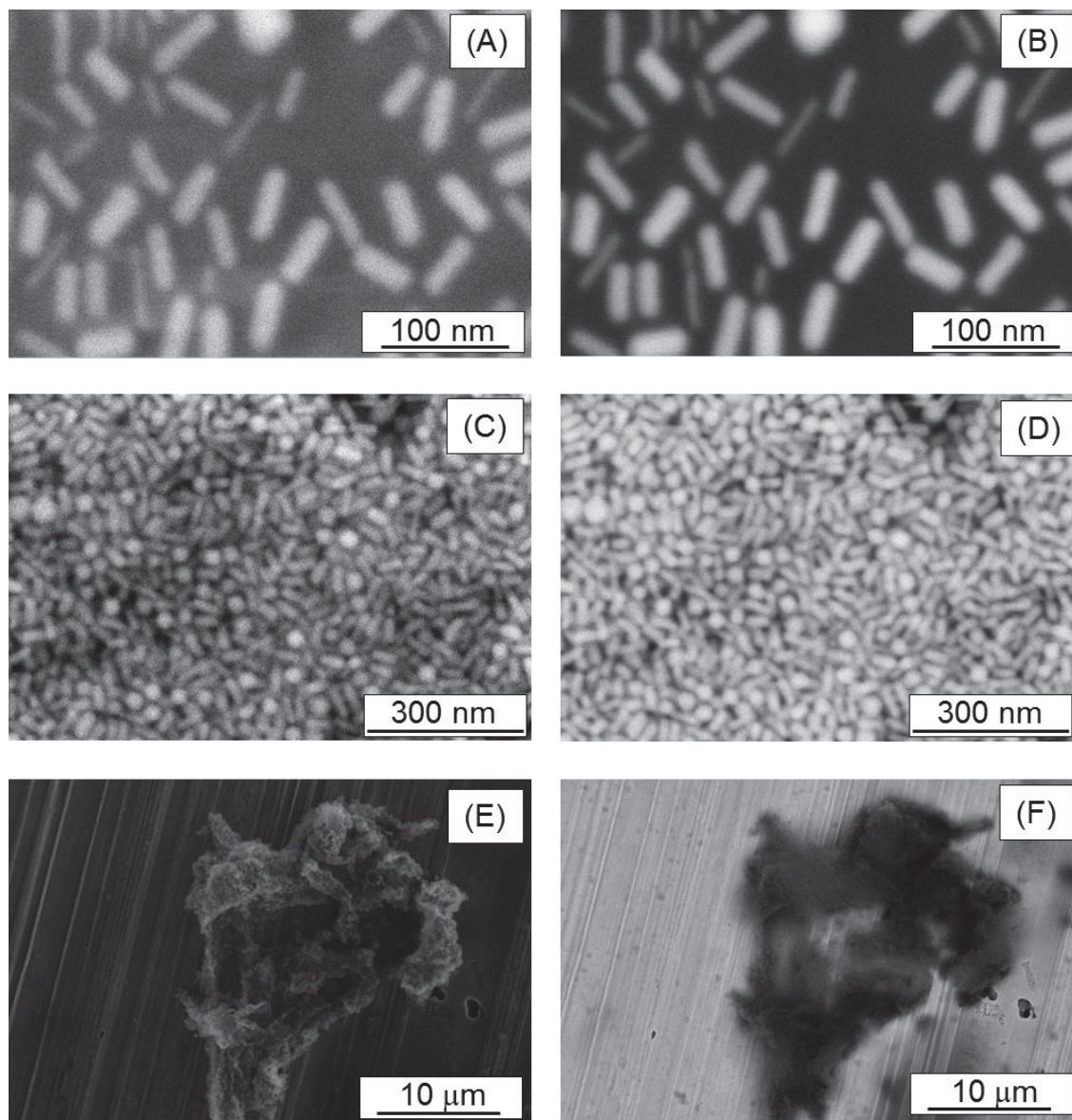
Imagens adicionais de MET dos (A e B) AuNRs, (C e D) GA@AuNRs e (E e F) ChiS@AuNRs.





## APÊNDICE 2

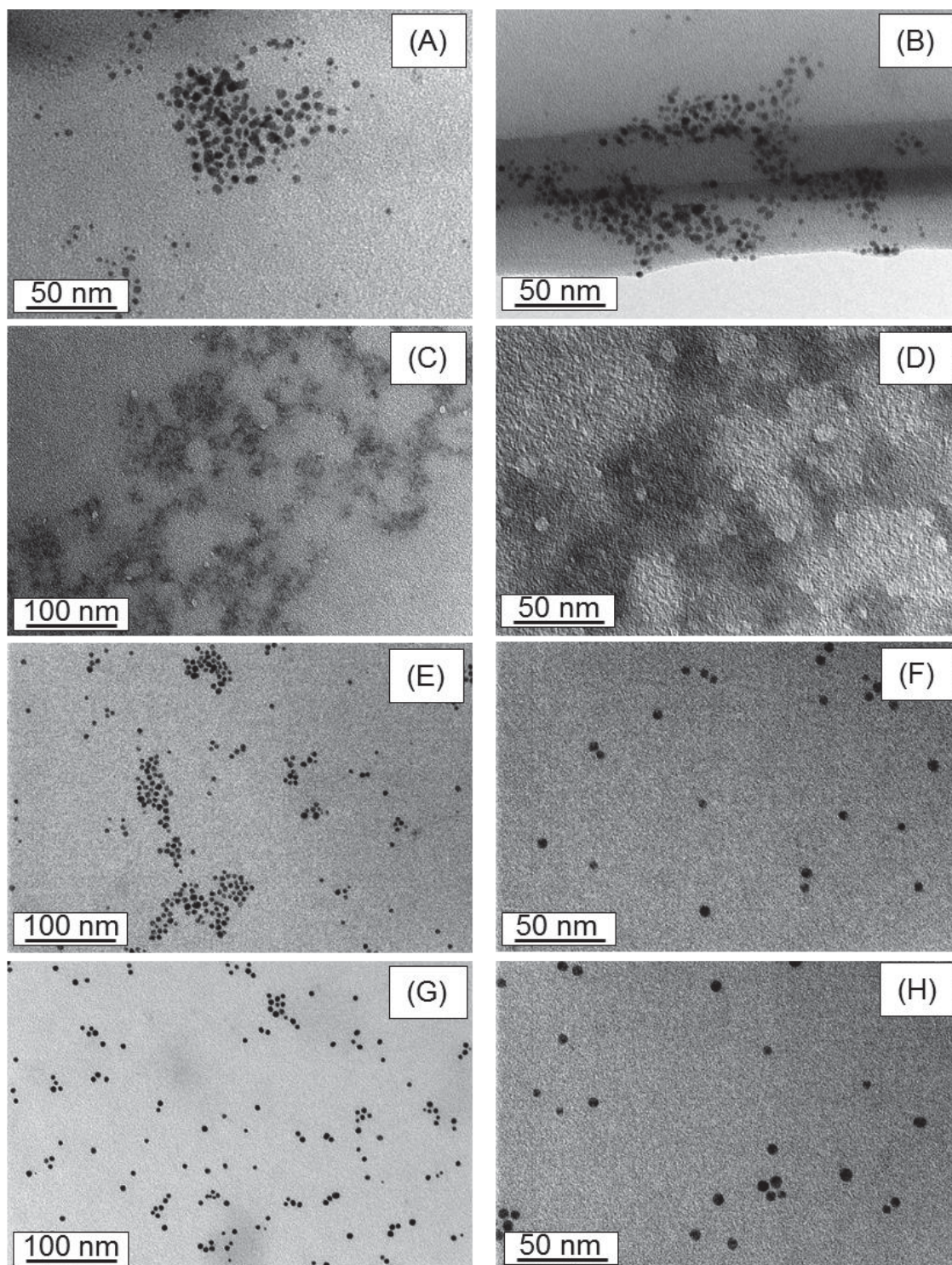
Imagens adicionais de MEV-HR dos (A e B) AuNRs, (C e D) GA@AuNRs e (E e F) ChiS@AuNRs. As imagens (A), (C) e (E) correspondem às imagens obtidas por elétrons secundários e as imagens (B), (D) e (F) correspondem às imagens obtidas por elétrons retroespalhados.





**APÊNDICE 3**

Imagens adicionais de MET das (A e B)  $_{SA}$ CALB@AuNPs, (C e D) CALB, (E e F) AuNPs estabilizadas por citrato e (G e H) CALB@AuNPs.

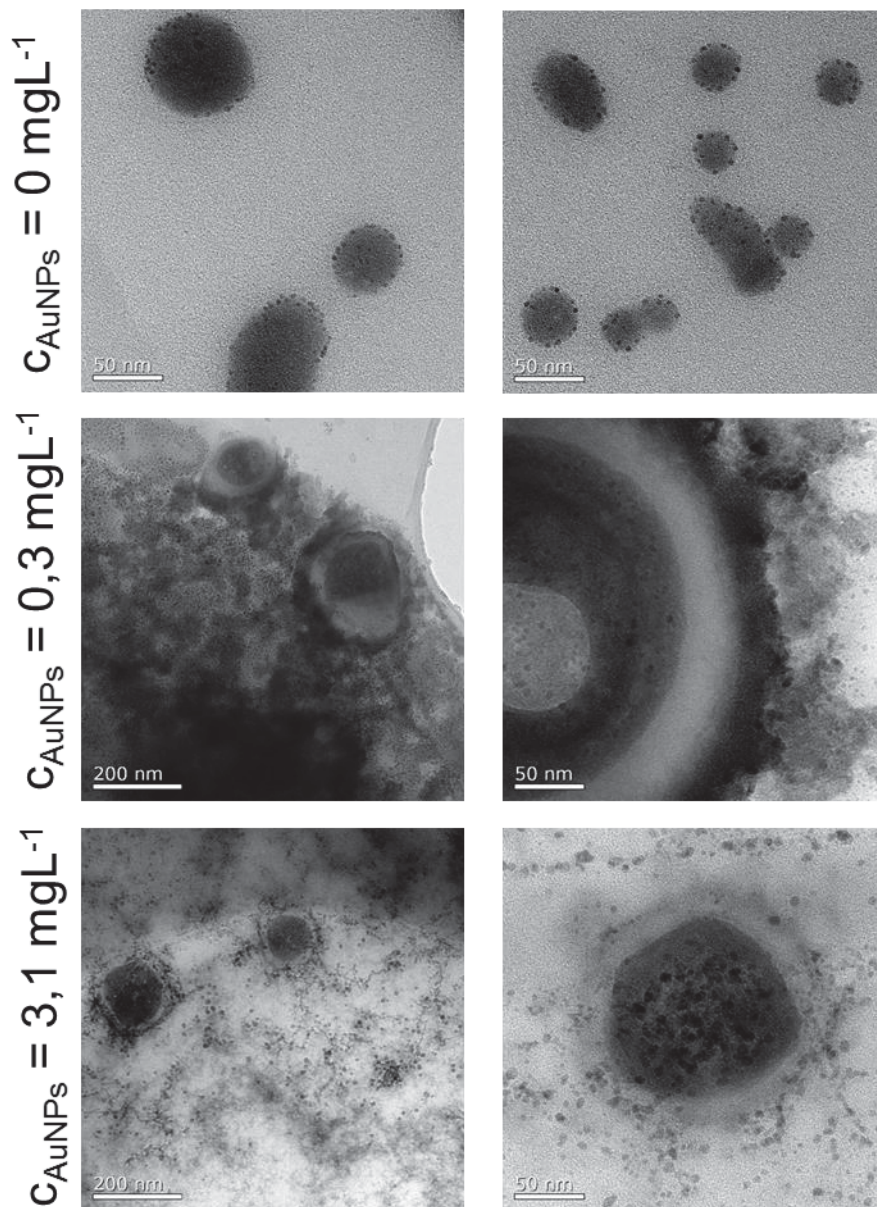




**APÊNDICE 4**

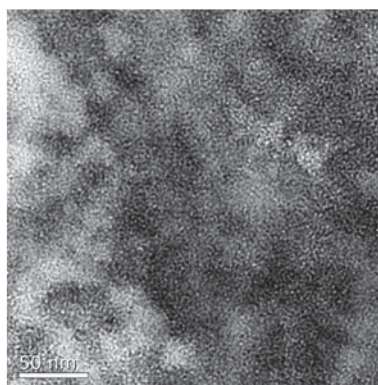
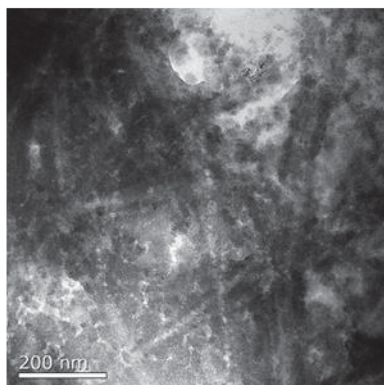
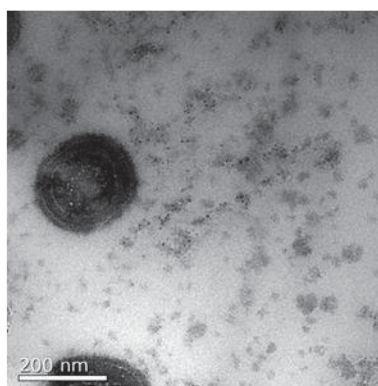
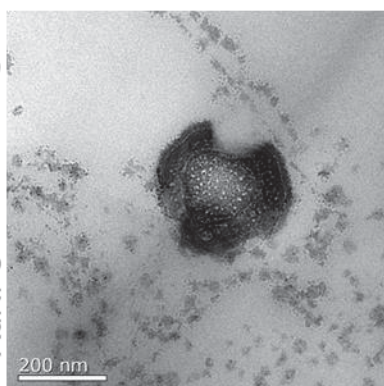
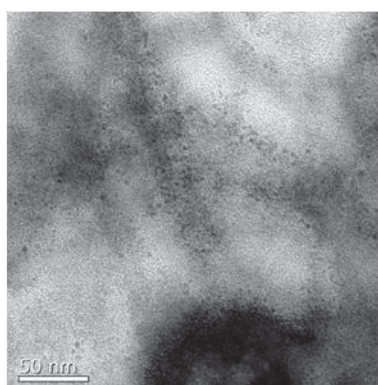
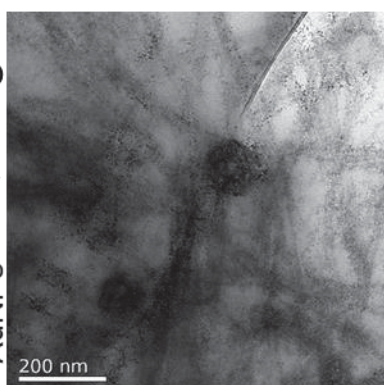
Imagens adicionais de MET obtidas durante o processo de fibrilação da lisozima nos tempos 0, 30 e 60 min com  $C_{AuNPs} = 0, 0,3$  e  $3,1 \text{ mgL}^{-1}$ .

0 min

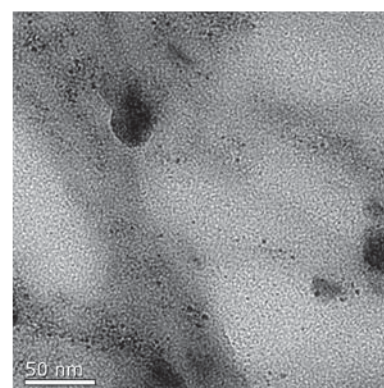
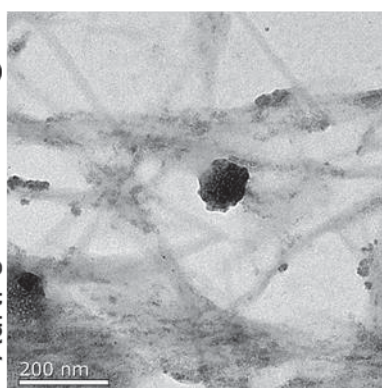
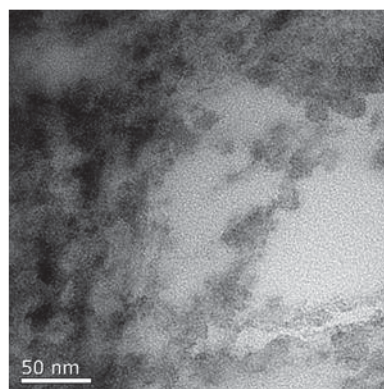
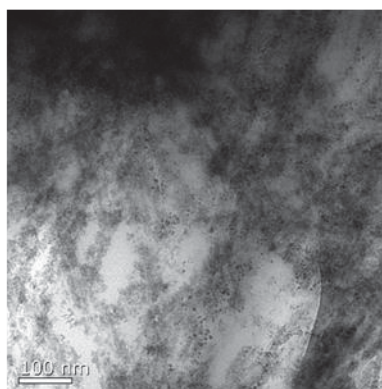
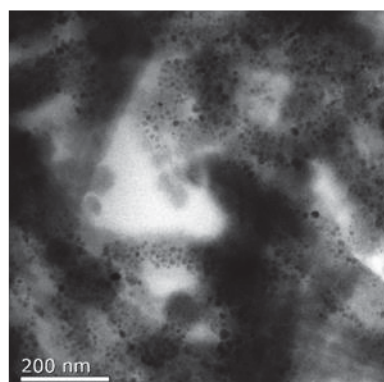
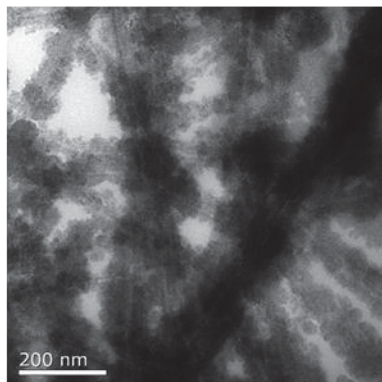




30 min

 $C_{\text{AuNPs}} = 0 \text{ mgL}^{-1}$  $C_{\text{AuNPs}} = 0,3 \text{ mgL}^{-1}$  $C_{\text{AuNPs}} = 3,1 \text{ mgL}^{-1}$ 

60 min

 $C_{\text{AuNPs}} = 3,1 \text{ mgL}^{-1}$   $C_{\text{AuNPs}} = 0,3 \text{ mgL}^{-1}$   $C_{\text{AuNPs}} = 0 \text{ mgL}^{-1}$ 

## ANEXO I

### INFORMAÇÕES ACADÊMICAS

Disciplinas realizadas como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química

Código	Disciplina	Crédito	Conceito
CQ820	Eletroquímica Avançada	4	A
CQ834	Introdução à Ciência de Polímeros	4	B
CQ836	Métodos Físicos de Análise Orgânica I	4	B
CQ736	Métodos Físico-Químicos de Caracterização de Macromoléculas e Interfaces	4	C
CQ792	Seminários A	1	A
CQ793	Seminários B	1	A
CQ736	Tópicos em Colóides e Química de Superfícies	4	A
CQ794	Seminários C	1	A
CQ833	Biocatálise	4	B
TEM730	Microscopia em Ciências dos Materiais	4	A
CQ736	Físico-Química Avançada	4	A
CQ795	Seminários D	1	A
CQ781	Prática de Docência em Química	1	A

Bolsista DAAD/CAPES em Doutorado Sanduíche no exterior pelo Programa DAAD Research Grants - Short-Term Grants:

Período da bolsa: 01/09/2016 a 31/01/2017 + 01/02/2017 à 31/03/2017 financiado com recursos do Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP)

Instituição de ensino: Max Planck Institute for Polymer Research (MPIP) – Mainz/Alemanha.

Orientadora: Profa. Dra. Katharina Landfester

Líder de Projeto: Dra. Héloïse Thérien-Aubin

## ANEXO II

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### Artigos completos aceitos e publicados em periódicos:

BARROS, H. R., CARDOSO, M.B., DE OLIVEIRA, C.C., FRANCO, C. R.C., BELAN, D.L., VIDOTTI, M., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. *Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines. RSC Advances*, 6 (2016) 9411-9420.

BARROS, H.R., PIOVAN, L., SASSAKI, G. L., SABRY, D.A., MATTOSO, N., NUNES, A.M., MENEGHETTI, M.R., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. *Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. Carbohydrate Polymers*, 152 (2016) 479-486.

BARROS, H.R., KOKKINOPOULOU, M., RIEGEL-VIDOTTI, I.C., LANDFESTER, K., THÉRIEN-AUBIN, H. *Gold nanocolloid-protein interactions and their impact on  $\beta$ -sheet amyloid fibril formation. RSC Advances*, 8 (2018) 980-986.

#### Apresentação de trabalhos em eventos na forma oral:

BARROS, H. R.; CARDOSO, M. B.; VIDOTTI, M.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C. In vitro stability studies of gum arabic as stabilizing agente of gold nanoparticles in physiological simulated media. XIV Latin American Symposium on Polymers, Porto de Galinhas/PE, outubro de 2014.

BARROS, H.R., SANTOS, M. C., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Gold nanoparticles obtained by ultrasound irradiation and their potential for enzyme immobilization. XIV Brazil MRS Meeting, Rio de Janeiro/RJ, setembro de 2015.

WOLFART, F., BARROS, H.R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Lipase-gold nanoparticles film on glass surface as a dual device: renewable biocatalyst and electrochemical biosensor. XVI Brazil MRS Meeting, Gramado/RS, setembro de 2017.



### **Apresentação de trabalhos em eventos na forma de pôster:**

SANTOS, M. C., BARROS, H. R., ORTH, E. S., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro obtidas por ultrassom e sua interação com enzimas. XXII Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), Joinville/SC, novembro de 2015.

BARROS, H. R., SANTOS, M. C., ORTH, E. S., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I. C. Gold nanoparticles obtained by influence of ultrasound and their potential for enzyme immobilization. 6 th TEM Summer School, Campinas/SP, janeiro de 2016.

SANTOS, M. C., BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. A brief study on the interaction between gold nanoparticles and CALB enzyme. 5<sup>th</sup> Meeting on self-assembly structures in solutions and at interfaces (AUTOORG), Florianópolis/SC, novembro de 2016.

BARROS, H. R., PIOVAN, L., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Gold nanoparticles as biocompatible surface for lipase adsorption: Physical-chemical study of the “nano-bio” interface. Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference (ANNIC), Barcelona/Espanha, novembro de 2016.

BARROS, H.R., SANTOS, M. C., PIOVAN, L., SASSAKI, G. L., SABRY, D.A., MATTOSO, N., NUNES, A.M., MENEGHETTI, M.R., GOLÇALVES, J.P., CRUZ, A.F., OLIVEIRA, C.C., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. distinct surface interactions in self-assembled structures of gold nanorods with polysaccharides and their cytotoxicity assays. IUPAC, São Paulo/SP, julho de 2017.

ROCHA, L.A., SANTOS, M. C., BARROS, H. R., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Distinct gold-nanostructures synthesized in presence of chitosan. XVI Brazil MRS Meeting, Gramado/RS, setembro de 2017.

JAGHER, M.O., SILVA, B.C., BARROS, H.R., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Silica nanoparticles as templates for the preparation of oppositely charged nanoparticles and their self-assembled behavior. XVI Brazil MRS Meeting, Gramado/RS, setembro de 2017.

BARROS, H. R., PIOVAN, L., BARBOSA, L.R.S., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Gold nanoparticles as biocompatible surface for lipase adsorption: Physical-chemical

study of the “nano-bio” interface. São Paulo School of Advanced Science on Biophysical Methods to study Biomolecular Interactions, São Paulo/SP, outubro de 2017.

BARROS, H. R., PIOVAN, L., BARBOSA, L.R.S., RIEGEL-VIDOTTI, I.C. Gold nanoparticles as biocompatible surface for lipase adsorption: Physical-chemical study of the “nano-bio” interface. XLII Congress of the Brazilian Biophysical Society (SBBf), Santos/SP, outubro de 2017.

### **Participação em cursos:**

Soft Materials. Instituto de Química –Unicamp, Campinas/SP, janeiro de 2015.

6th TEM Summer School, CNPEM-LNNano, Campinas/SP, janeiro de 2016.

São Paulo School of Advanced Science on Biophysical Methods to study Biomolecular Interactions, Instituto de Física-USP, São Paulo/SP, outubro de 2017.

### **Prêmios:**

Prêmio de melhor apresentação de pôster, com o trabalho: Gold nanoparticles as biocompatible surface for lipase adsorption: Physical-chemical study of the “nano-bio” interface. XLII Congress of the Brazilian Biophysical Society (SBBf), Santos/SP, outubro de 2017.

# ANEXO III

## DIREITOS AUTORAIS DAS IMAGENS UTILIZADAS NA TESE

14/03/2018 RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 14, 2018

This Agreement between Universidade Federal do Paraná – Heloíse Ribeiro de Barros ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4307711453157
License date	Mar 14, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	International Journal of Biological Macromolecules
Licensed Content Title	Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications
Licensed Content Author	A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba
Licensed Content Date	Dec 1, 2017
Licensed Content Volume	105
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	11
Start Page	1358
End Page	1368
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	portuguese english
Original figure numbers	Fig 2
Title of your thesis/dissertation	INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO
Expected completion date	Mar 2018
Estimated size (number of pages)	120
Requestor Location	Universidade Federal do Paraná Universidade Federal do Paraná Centro Politécnico Curitiba, 81531-980 Brazil Attn: Universidade Federal do Paraná
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

### INTRODUCTION

<https://100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

**GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:  
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]". Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions.

1/5

<https://100.copyright.com/AppDispatchServlet>

2/5

14/03/2018 RightsLink Printable License

terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

**LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image. A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>. Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**  
A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).  
Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).  
If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscript:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.  
Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately

<https://100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

- via their non-commercial personal homepage or blog
- by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
- via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
- directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
- for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement

- After the embargo period
- via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
- via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (JPA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-journaling, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles.

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a **CrossMark** logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's **posting policy** for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:  
Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

**Elsevier Open Access Terms and Conditions**  
You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third

3/5

<https://100.copyright.com/AppDispatchServlet>

4/5



14/03/2018 RightsLink Printable License

**ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 14, 2018

---

This Agreement between Universidade Federal do Paraná -- Heloise Ribeiro de Barros ("You") and Royal Society of Chemistry ("Royal Society of Chemistry") consists of your license details and the terms and conditions provided by Royal Society of Chemistry and Copyright Clearance Center.

License Number 4307691487333  
 License date Mar 14, 2018  
 Licensed Content Publisher Royal Society of Chemistry  
 Licensed Content Publication Chemical Society Reviews  
 Licensed Content Title Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes  
 Licensed Content Author Susie Eustis, Mostafa A. El-Sayed  
 Licensed Content Date Dec 16, 2005  
 Licensed Content Volume 35  
 Licensed Content Issue 3  
 Type of Use Thesis/Dissertation  
 Requestor type academic/educational  
 Portion figures/tables/images  
 Number of figures/tables/images 1  
 Format electronic  
 Distribution quantity 1  
 Will you be translating? yes  
 Number of languages 1  
 Order reference number  
 Languages Portuguese English  
 Title of the thesis/dissertation INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO  
 Expected completion date Mar 2018  
 Estimated size 120  
 Requestor Location Universidade Federal do Paraná  
 Universidade Federal do Paraná  
 Centro Politécnico  
 Curitiba, 81531-980  
 Brazil  
 Attn: Universidade Federal do Paraná  
 Billing Type Invoice  
 Billing Address Universidade Federal do Paraná  
 Universidade Federal do Paraná  
 Centro Politécnico  
 Curitiba, Brazil 81531-980  
 Attn: Universidade Federal do Paraná

<https://rsc/100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

0.00 USD

Total

Terms and Conditions

This License Agreement is between (Requestor Name) ("You") and The Royal Society of Chemistry ("RSC") provided by the Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by the Royal Society of Chemistry, and the payment terms and conditions.

**RSC / TERMS AND CONDITIONS**

**INTRODUCTION**  
 The publisher for this copyrighted material is The Royal Society of Chemistry. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by CCC, at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at .

**LICENSE GRANTED**  
 The RSC hereby grants you a non-exclusive license to use the aforementioned material anywhere in the world subject to the terms and conditions indicated herein. Reproduction of the material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

**RESERVATION OF RIGHTS**  
 The RSC reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction; (ii) these terms and conditions; and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

**REVOCATION**  
 The RSC reserves the right to revoke this license for any reason, including, but not limited to, advertising and promotional uses of RSC content, third party usage, and incorrect source figure attribution.

**THIRD-PARTY MATERIAL DISCLAIMER**  
 If part of the material to be used (for example, a figure) has appeared in the RSC publication with credit to another source, permission must also be sought from that source. If the other source is another RSC publication these details should be included in your RightsLink request. If the other source is a third party, permission must be obtained from the third party. The RSC disclaims any responsibility for the reproduction you make of items owned by a third party.

**PAYMENT OF FEE**  
 If the permission fee for the requested material is waived in this instance, please be advised that any future requests for the reproduction of RSC materials may attract a fee.

**ACKNOWLEDGEMENT**  
 The reproduction of the licensed material must be accompanied by the following acknowledgement:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry.  
 If the licensed material is being reproduced from New Journal of Chemistry (NJC), Photochemical & Photobiological Sciences (PPS) or Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP) you must include one of the following acknowledgements:  
 For figures originally published in NJC:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association and the RSC.  
 For figures originally published in PPS:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.  
 For figures originally published in PCCP:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The PCCP Owner Societies.

**HYPERTEXT LINKS**  
 With any material which is being reproduced in electronic form, you must include a hypertext link to the original RSC article on the RSC's website. The recommended form for the hypertext link is <http://dx.doi.org/10.1039/DOI> suffix, for example in the link

<https://rsc/100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

<http://dx.doi.org/10.1039/b110420a> the DOI suffix is "b110420a". To find the relevant DOI suffix for the RSC article in question, go to the Journals section of the website and locate the article in the list of papers for the volume and issue of your specific journal. You will find the DOI suffixes quoted there.

**LICENSE CONTINGENT ON PAYMENT**  
 While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and the RSC reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

**WARRANTIES**  
 The RSC makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

**INDEMNITY**  
 You hereby indemnify and agree to hold harmless the RSC and the CCC, and their respective officers, directors, trustees, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

**NO TRANSFER OF LICENSE**  
 This license is personal to you or your publisher and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without the RSC's written permission.

**NO AMENDMENT EXCEPT IN WRITING**  
 This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of "Other Conditions, v1.2" by CCC on the RSC's behalf).

**OBJECTION TO CONTRARY TERMS**  
 You hereby acknowledge and agree that these terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and the RSC (and CCC) concerning this licensing transaction, to the exclusion of all other terms and conditions, written or verbal, express or implied (including any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you). In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

**JURISDICTION**  
 This license transaction shall be governed by and construed in accordance with the laws of the District of Columbia. You hereby agree to submit to the jurisdiction of the courts located in the District of Columbia for purposes of resolving any disputes that may arise in connection with this licensing transaction.

**LIMITED LICENSE**  
 The following terms and conditions apply to specific license types:  
**Translation**  
 This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.  
**Intranet**  
 If the licensed material is being posted on an Intranet, the Intranet is to be password-protected and made available only to bona fide students or employees only. All content posted to the Intranet must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You must also fully reference the material and include a hypertext link as specified above.

<https://rsc/100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

**Copies of Whole Articles**  
 All copies of whole articles must maintain, if available, the copyright information line on the bottom of each page.

**Other Conditions**  
 v1.2  
 Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.  
 If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number [Invoice Number]. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card.  
 Please follow instructions provided at that time.  
 Make Payment To:  
 Copyright Clearance Center  
 2918 Network Place  
 Chicago, IL 60673-1291  
 For suggestions or comments regarding this order, contact Rightslink Customer Support: [customerscare@copyright.com](mailto:customerscare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**Questions? [customerscare@copyright.com](mailto:customerscare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

14/03/2018 RightsLink Printable License

**ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 14, 2018

---

This Agreement between Universidade Federal do Paraná – Heloise Ribeiro de Barros ("You") and Royal Society of Chemistry ("Royal Society of Chemistry") consists of your license details and the terms and conditions provided by Royal Society of Chemistry and Copyright Clearance Center.

License Number 4307721330111  
 License date Mar 14, 2018  
 Licensed Content Publisher Royal Society of Chemistry  
 Licensed Content Publication Chemical Communications (Cambridge)  
 Licensed Content Title Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors  
 Licensed Content Author Achikanath C. Bhasikuttan, Jyoti Mayee Mohanty  
 Licensed Content Date Feb 7, 2017  
 Licensed Content Volume 53  
 Licensed Content Issue 19  
 Type of Use Thesis/Dissertation  
 Requestor type academic/educational  
 Portion figures/tables/images  
 Number of figures/tables/images 1  
 Format print and electronic  
 Distribution quantity 1  
 Will you be translating?  
 Order reference number

Title of the thesis/dissertation INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO  
 Expected completion date Mar 2018  
 Estimated size 120  
 Requestor Location Universidade Federal do Paraná  
 Universidade Federal do Paraná  
 Centro Politécnico  
 Curitiba, 81531-980  
 Brazil  
 Attn: Universidade Federal do Paraná  
 Billing Type Invoice  
 Billing Address Universidade Federal do Paraná  
 Universidade Federal do Paraná  
 Centro Politécnico  
 Curitiba, Brazil 81531-980  
 Attn: Universidade Federal do Paraná  
 Total 0.00 USD  
 Terms and Conditions

This License Agreement is between (Requestor Name) ("You") and The Royal Society of Chemistry ("RSC") provided by the Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of

<https://rsc100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/4

14/03/2018 RightsLink Printable License

your order details, the terms and conditions provided by the Royal Society of Chemistry, and the payment terms and conditions.

**RSC / TERMS AND CONDITIONS**

**INTRODUCTION**  
 The publisher for this copyrighted material is The Royal Society of Chemistry. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by CCC, at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at .

**LICENSE GRANTED**  
 The RSC hereby grants you a non-exclusive license to use the aforementioned material anywhere in the world subject to the terms and conditions indicated herein. Reproduction of the material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

**RESERVATION OF RIGHTS**  
 The RSC reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction; (ii) these terms and conditions; and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

**REVOCATION**  
 The RSC reserves the right to revoke this license for any reason, including, but not limited to, advertising and promotional uses of RSC content, third party usage, and incorrect source figure attribution.

**THIRD-PARTY MATERIAL DISCLAIMER**  
 If part of the material to be used (for example, a figure) has appeared in the RSC publication with credit to another source, permission must also be sought from that source. If the other source is another RSC publication these details should be included in your RightsLink request. If the other source is a third party, permission must be obtained from the third party. The RSC disclaims any responsibility for the reproduction you make of items owned by a third party.

**PAYMENT OF FEE**  
 If the permission fee for the requested material is waived in this instance, please be advised that any future requests for the reproduction of RSC materials may attract a fee.

**ACKNOWLEDGEMENT**  
 The reproduction of the licensed material must be accompanied by the following acknowledgement:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry.  
 If the licensed material is being reproduced from New Journal of Chemistry (NJC), Photochemical & Photobiological Sciences (PPS) or Physical Chemistry Chemical Physics (PCCP) you must include one of the following acknowledgements:  
 For figures originally published in NJC:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association and the RSC.  
 For figures originally published in PPS:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.  
 For figures originally published in PCCP:  
 Reproduced ("Adapted" or "in part") from [Reference Citation] (or Ref XX) with permission of the PCCP Owner Societies.

**HYPERTEXT LINKS**  
 With any material which is being reproduced in electronic form, you must include a hyperlink link to the original RSC article on the RSC's website. The recommended form for the hyperlink is <http://dx.doi.org/10.1039/DOI.suffix>, for example in the link <http://dx.doi.org/10.1039/b110420a>. To find the relevant DOI suffix for the RSC article in question, go to the Journals section of the website and locate the article in the list of papers for the volume and issue of your specific journal. You will find the DOI suffix quoted there.

<https://rsc100.copyright.com/AppDispatchServlet>

2/4

14/03/2018 RightsLink Printable License

**LICENSE CONTINGENT ON PAYMENT**  
 While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and the RSC reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

**WARRANTIES**  
 The RSC makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

**INDEMNITY**  
 You hereby indemnify and agree to hold harmless the RSC and the CCC, and their respective officers, directors, trustees, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

**NO TRANSFER OF LICENSE**  
 This license is personal to you or your publisher and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without the RSC's written permission.

**NO AMENDMENT EXCEPT IN WRITING**  
 This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of "Other Conditions, v1.2", by CCC on the RSC's behalf).

**OBJECTION TO CONTRARY TERMS**  
 You hereby acknowledge and agree that these terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and the RSC (and CCC) concerning this licensing transaction, to the exclusion of all other terms and conditions, written or verbal, express or implied (including any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you). In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

**JURISDICTION**  
 This license transaction shall be governed by and construed in accordance with the laws of the District of Columbia. You hereby agree to submit to the jurisdiction of the courts located in the District of Columbia for purposes of resolving any disputes that may arise in connection with this licensing transaction.

**LIMITED LICENSE**  
 The following terms and conditions apply to specific license types:  
 Translation  
 This permission is granted for non-exclusive world English rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.  
 Intranet  
 If the licensed material is being posted on an Intranet, the Intranet is to be password-protected and made available only to bona fide students or employees only. All content posted to the Intranet must maintain the copyright information line on the bottom of each image. You must also fully reference the material and include a hyperlink link as specified above.  
 Copies of Whole Articles  
 All copies of whole articles must maintain, if available, the copyright information line on the bottom of each page.  
 Other Conditions  
 v1.2

<https://rsc100.copyright.com/AppDispatchServlet>

3/4

14/03/2018 RightsLink Printable License

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number (Invoice Number). Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card.

Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:  
 Copyright Clearance Center  
 29118 Network Place  
 Chicago, IL 60673-1291  
 For suggestions or comments regarding this order, contact Rightslink Customer Support: [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**Questions? [customer-care@copyright.com](mailto:customer-care@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

<https://rsc100.copyright.com/AppDispatchServlet>

4/4

14/03/2018 RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 14, 2018

---

This Agreement between Universidade Federal do Paraná – Heloíse Ribeiro de Barros ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4307731454075
License date	Mar 14, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Molecular Biology
Licensed Content Title	Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism
Licensed Content Author	S. Brahms, J. Brahms
Licensed Content Date	Apr 5, 1980
Licensed Content Volume	138
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	30
Start Page	149
End Page	178
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	portuguese english
Original figure numbers	Fig 2
Title of your thesis/dissertation	INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS DE OURO E BIOMOLÉCULAS: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA INTERFACE NANO-BIO
Expected completion date	Mar 2018
Estimated size (number of pages)	120
Requestor Location	Universidade Federal do Paraná Universidade Federal do Paraná Centro Politécnico  Curitiba, 81531-980 Brazil Attn: Universidade Federal do Paraná
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

13. Objection to Contrary Terms. Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation. Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

**LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation.** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website.** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve.** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**  
A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, (it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

**INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

**GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>

14/03/2018 RightsLink Printable License

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (JPA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) license, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reply for permission. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

<https://is100.copyright.com/AppDispatchServlet>



14/03/2018 RightsLink Printable License

**Elsevier Open Access Terms and Conditions**  
 You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

**Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**  
 Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.  
 The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.  
 If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

**Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**  
**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.  
**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.  
**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.  
 Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.  
 Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons



Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

#### 20. Other Conditions:


v1.9

**Questions?** [customerscare@copyright.com](mailto:customerscare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

<https://rightslink.com/copyright/copyright/PersonalUse>

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


**Title:** The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment  
**Author:** K. Lance Kelly, Eduardo Coronado, Lin Lin Zhao, et al  
**Publication:** The Journal of Physical Chemistry B  
**Publisher:** American Chemical Society  
**Date:** Jan 1, 2003  
Copyright © 2003, American Chemical Society

Logged in as:  
 Heloise Ribeiro de Barros  
 Universidade Federal do Paraná  
[LOGOUT](#)

#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

Seguro | <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use>



SEARCH CART MENU

## Personal use

Authors can use their articles, in full or in part, for a wide range of scholarly, non-commercial purposes as outlined below:

- Use by an author in the author's classroom teaching (including distribution of copies, paper or electronic)
- Distribution of copies (including through e-mail) to known research colleagues for their personal use (but not for Commercial Use)
- Inclusion in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- Use in a subsequent compilation of the author's works
- Extending the Article to book-length form
- Preparation of other derivative works (but not for Commercial Use)
- Otherwise using or re-using portions or excerpts in other works

These rights apply for all Elsevier authors who publish their article as either a subscription article or an open access article. In all cases we require that all Elsevier authors always include a full acknowledgement and, if appropriate, a link to the final published version hosted on Science Direct.

[www.rsc.org/journals-books-databases/journal-authors-reviewers/licences-copyright-permissions/#reuse-permission-requests](http://www.rsc.org/journals-books-databases/journal-authors-reviewers/licences-copyright-permissions/#reuse-permission-requests)

## Re-use permission requests

Material published by the Royal Society of Chemistry and other publishers is subject to all applicable copyright, database protection, and other rights. Therefore, for any publication, whether printed or electronic, permission must be obtained to use material for which the author(s) does not already own the copyright. This material may be, for example, a figure, diagram, table, photo or some other image.

### Author reusing their own work published by the Royal Society of Chemistry

You do not need to request permission to reuse your own figures, diagrams, etc., that were originally published in a Royal Society of Chemistry publication. However, permission should be requested for use of the whole article or chapter except if reusing it in a thesis. If you are including an article or book chapter published by us in your thesis please ensure that your co-authors are aware of this.

Reuse of material that was published originally by the Royal Society of Chemistry must be accompanied by the appropriate acknowledgement of the publication. The form of the acknowledgement is dependent on the journal in which it was published originally, as detailed in 'Acknowledgements'.